

**ENTWICKLUNG EINES
CYTOGENETISCHEN TESTSYSTEMS
ZUM NACHWEIS MUTAGENER
SUBSTANZEN**

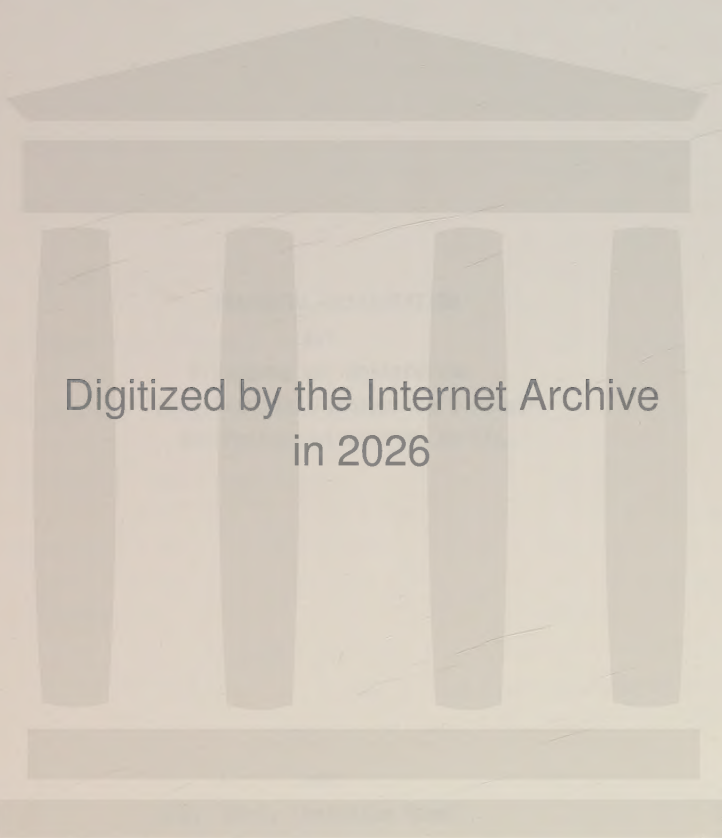
**Untersuchungen mit CHO-Zellen und
menschlichen Lymphozyten**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Dipl. Biol. Christian Nowak
aus Berlin

1983





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546607_0019

Druck: Copy-Center in Dahlem
Ladenbergstraße 2-4
1000 Berlin 33
Tel. 831 40 25

ENTWICKLUNG EINES CYTOGENETISCHEN TESTSYSTEMS
ZUM NACHWEIS MUTAGENER SUBSTANZEN
UNTERSUCHUNGEN MIT CHO-ZELLEN UND MENSCHLICHEN LYMPHOZYTEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

von
Dipl. Biol. Christian Nowak
aus Berlin

Erster Referent: Prof. Dr. G. Obe

Zweiter Referent: Priv. Doz. Dr. B. Beek

Tag der Promotion: 31.5.83

I N H A L T

	<u>Seite</u>
ZUSAMMENFASSUNG	4
EINLEITUNG	5
TESTSUBSTANZEN	20
MATERIAL UND METHODEN	29
ERGEBNISSE LYMPHOZYTENKULTUREN	39
ERGEBNISSE CHO-KULTUREN	114
DISKUSSION	142
LITERATUR	176

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde ein cytogenetisches Testsystem zur Analyse der molekularen Mechanismen bei der Entstehung chromosomaler Aberrationen weiterentwickelt. Dieses Testsystem kann zum Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen verwendet werden. Außerdem wurde ein weiterer Beweis für die Beteiligung von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Entstehung chromosomaler Aberrationen erbracht.

Zellkulturen des Chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) und menschliche Lymphozyten wurden in unterschiedlichen Zellzyklusstadien mit Mutagenen behandelt und mit einer einzelstrangspezifischen Endonuclease von *Neurospora crassa* (NE) nachbehandelt. Das Enzym transformiert Einzelstrangbrüche in Doppelstrangbrüche, was in der darauffolgenden Mitose zu einer erhöhten Rate chromosomaler Aberrationen führt.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- NE-Behandlung allein, in G1 sowie in G2, führt in CHO-Zellen und menschlichen Lymphozyten zu keiner oder nur zu einer minimalen Erhöhung der Rate chromosomaler Aberrationen.
- NE-Behandlung während der S-Phase führt in Lymphozyten zu einem Anstieg der Rate chromosomaler Aberrationen.
- Bei Behandlung mit Bleomycin, Röntgenstrahlen oder monofunktionellen Alkylantien in G2 führte die Nachbehandlung mit NE zu einem deutlichen Anstieg der Chromatidenaberrationen.

Bei Röntgenbestrahlung in G1 führte die Nachbehandlung mit NE zu einem deutlichen Anstieg der Chromosomenaberrationen.

Die Ergebnisse werden dahingehend interpretiert, daß NE einige Einzelstrangbrüche in Doppelstrangbrüche überführt, die dann direkt zu Aberrationen führen.

- Bei Behandlung mit alkylierenden Agenzien in G1 induzierte die Nachbehandlung mit NE vermehrt Chromatiden- und Chromosomenaberrationen. Die Ergebnisse zeigen, daß durch die Nachbehandlung mit NE sowohl Basenschäden in Einzelstrangbrüche, als auch Einzelstrangbrüche in Doppelstrangbrüche transformiert werden.
- Bei Behandlung mit polyfunktionellen Alkylantien in G2 führte die Nachbehandlung mit NE nicht zu erhöhten Raten chromosomaler Aberrationen, da diese Substanzen keine Einzelstrangbrüche induzieren ist für das Enzym kein Substrat vorhanden.

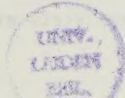
EINLEITUNG

Das eukaryote Chromosom besteht aus Chromatin, einem Komplex aus Desoxyribonucleinsäure (DNA) und Proteinen. Der Aufbau des DNA-Moleküls in Form einer Doppelhelix ist von WATSON und CRICK (1953a,b) ausführlich beschrieben worden. Das Zusammenwirken von DNA und Proteinen in den Chromosomen konnte dagegen noch nicht in allen Einzelheiten geklärt werden. OLINS und OLINS (1974) und OUDET et al. (1975) gelang es als ersten nachzuweisen, daß eukaryote Chromosomen aus Nucleosomen aufgebaut sind. In der Folgezeit waren KORNBERG (1977), FELSENFELD (1978), LILLEY und PARDON (1979), ALLAN et al. (1980), LASKEY und EARNSHAW (1980) maßgeblich an der Aufklärung der chromosomalen Ultrastruktur beteiligt. Die Richtigkeit des Nucleosomen Modells gilt heute durch eine Vielzahl biochemischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen als gesichert (CSH 1978).

Chromosomen enthalten DNA, Histone (im Verhältnis 1:1) und Nicht-histone. Vier verschiedene Histone (H2a, H2b, H3 und H4) bilden ein zylinderförmiges Oktamer. Auf der Oberfläche lagert sich die DNA an, wobei 166 Nucleotidpaare zwei volle Windungen um ein Histon Oktamer bilden ("core particle"). Der Durchmesser dieser Nucleosomen beträgt ca. 100 Ångström, was einer Kontraktion der DNA auf 1/7 ihrer ursprünglichen Länge entspricht (SEDAT und MANUELIDIS 1978). Die Nucleosomen sind durch DNA, die nicht mit Proteinen assoziiert ist, miteinander verbunden ("spacer"). Diese Anordnung wird im Elektronenmikroskop als perlenkettenartige Struktur sichtbar.

Die weitere Kondensation der Chromatinfibrille ist die Voraussetzung für eine korrekte Verteilung der genetischen Information während der Mitose. Es muß eine Kontraktion, ausgehend von der DNA-Doppelhelix, bis zum Metaphasechromosom um den Faktor 5000 erfolgen. Mit Hilfe des fünften Histons (H1) bilden die Nucleosomen bei steigender Salzkonzentration Solenoide, die wahrscheinlich aus sechs Nucleosomen bestehen, was zu einer Fibrillenstärke von ca. 300 Ångström führt. Durch weitere Partikelvergrößerung und Fibrillenverdickung wird das Chromatin soweit kondensiert, daß es als Metaphasechromosom lichtmikroskopisch sichtbar wird.

Eine weitere Frage ist, ob das eukaryote Chromosom nur eine durch-



gehende Nucleosomenkette enthält ("uninemisch") oder mehrsträngig ist ("polynemisch").

Frühe lichtmikroskopische Untersuchungen sprachen für einen polynemischen Chromosomenaufbau (NEBEL 1941; BAJER 1965; SPARVOLI et al. 1965). Als Hauptbeweis wurde angeführt, daß Anaphasechromosomen aus mehreren Chromatiden bestehen und häufig Anaphasebrücken bilden.

TAYLOR (1963) dagegen postulierte, daß die Chromosomen auch in der Anaphase nur aus einer DNA-Doppelhelix bestehen und eine morphologische Einheit bilden. Mehrere Chromatiden in der Anaphase könnten auf Fixierungsartefakten beruhen, denn in der lebenden Zelle konnte dieses Phänomen nicht beobachtet werden.

In der Folgezeit befürworteten nur noch WOLFF (1969) und STUBBLEFIELD (1973) den polynemischen Chromosomenaufbau.

Die Mehrzahl der Beweise spricht mittlerweile für den uninemischen Chromosomenaufbau:

- (1) Elektronenmikroskopische Untersuchungen von DU PRAW (1970), PRESCOTT (1970) und THOMAS (1971).
- (2) Untersuchungen über die Ursachen von Subchromatidenaustauschen von KIHLMAN (1970) und KIHLMAN und KRONBORG (1972).
- (3) Erklärungen für Isolabelling von KORENBERG und FREIFELDER (1974) und WOLFF und PERRY (1974, 1975).
- (4) Enzym-Verdauungs-Experimente an Lampenbürstenchromosomen von GALL (1963).
- (5) Vergleich von DNA-Molekulargewicht mit der cytologischen Chromosomengröße und dem DNA-Gehalt von KAVENOFF und ZIMM (1973), KAVENOFF et al. (1974), CRYER et al. (1974), PETES et al. (1974).

Schon lange ist bekannt, daß strukturelle und numerische Chromosomenaberrationen spontan in Soma- und Keimzellen, sowohl in pflanzlichen als auch tierischen Organismen vorkommen. Diese Spontanrate ist niedrig, kann aber durch Umwelteinflüsse wie Strahlen oder Chemikalien drastisch gesteigert werden.

Die Erforschung chromosomaler Aberrationen begann, als MULLER (1927) nachweisen konnte, daß Röntgenstrahlen bei *Drosophila* Mutationen auslösen. STADLER (1928) konnte dieses Ergebnis an Pflanzen bestätigen; PAINTER und MULLER (1929) verwendeten erstmals cytologische Methoden. In den folgenden Jahren wurde eine Vielzahl von Organismen ionisierender Strahlung ausgesetzt, was stets eine Erhöhung der Mutationsrate

zur Folge hatte (TIMOFEEF-RESSOVSKY 1934; MULLER 1954a,b).

Nach vielen widersprüchlichen Ergebnissen konnte erst in den vierziger Jahren der eindeutige Beweis erbracht werden, daß auch UV-Licht und Chemikalien chromosomale Aberrationen induzieren (SWANSON 1940; OEHLKERS 1943; AUERBACH und ROBSON 1944; 1946; DARLINGTON und KOLLER 1947).

Als Angriffspunkt der mutagenen Wirkung von Strahlen und Chemikalien kommen entweder die chromosomalen Proteine oder die DNA in Frage. Heute gilt es durch eine Vielzahl direkter und indirekter Beweise als gesichert, daß die DNA das primäre Target für die Entstehung von strukturellen Aberrationen ist. Eine zumindest indirekte Beteiligung der Proteinkomponente an der Aberrationsentstehung ist nicht auszuschließen, da viele Mutagene eine Hemmung von Protein- und RNA-Synthese oder DNA-Protein cross-links induzieren. Einige wichtige Beweise für die Beteiligung der DNA an der Entstehung chromosomaler Aberrationen sollen im Folgenden aufgeführt werden:

- (1) Bestrahlung mit UV-Licht von 265 nm Wellenlänge induziert mehr strukturelle Aberrationen als jede andere Wellenlänge. Dies entspricht dem Absorptionsmaximum der DNA für UV-Licht (CHU 1965).
- (2) Einbau von Thymin Analoga (BUdR und IUdR) in die DNA führt zu einer erheblich gesteigerten Aberrationsrate nach UV- und Röntgenbestrahlung im Vergleich zu nicht substituierter DNA (KIHLMAN 1963; SOMERS und HUMPHREY 1963; KIHLMAN et al. 1978; NATARAJAN et al. 1980).
- (3) Durch Photoreaktivierung konnte die Anzahl der Chromatidenaberrationen bei Fibroblasten von *Xenopus laevis* und embryonalen Hühnerfibroblasten nach UV-Bestrahlung reduziert werden. Entsprechende Versuche mit CHO-Zellen zeigten diesen Effekt nicht, da diese Zellen kein photoreaktivierendes Enzym besitzen. Daraus schlossen die Autoren, daß die wichtigste Primärläsion bei der Entstehung von strukturellen Aberrationen nach UV-Bestrahlung das Pyrimidin-Dimer ist (GRIGGS und BENDER 1973; NATARAJAN et al. 1980; VAN ZEELAND et al. 1980).
- (4) Die Fähigkeit monofunktioneller alkylierender Agenzien chromosomale Aberrationen zu induzieren ist direkt korreliert mit ihrer Fähigkeit nucleophile Bereiche der DNA zu alkylieren (VOGEL und NATARAJAN 1979a,b).
- (5) Nachbehandlung röntgenbestrahlter CHO-Zellen mit *Neurospora* Endo-

nuclease erhöht die Rate der strukturellen Aberrationen erheblich (NATARAJAN und OBE 1978).

Nach der allgemeingültigen Lehrbuchmeinung werden Mutagene in zwei Klassen eingeteilt: S-Phase unabhängige Agentien induzieren Aberrationen in allen Zellzyklusstadien. Behandlung vor der S-Phase führt zu Chromosomenaberrationen, Behandlung nach der S-Phase zu Chromatidenaberrationen. S-Phase-abhängige Agentien induzieren direkt keine DNA-Strangbrüche. Die Zelle muß erst eine S-Phase durchlaufen, bevor strukturelle Aberrationen in der Mitose sichtbar werden. Behandlung vor der S-Phase führt zu Chromatidenaberrationen, Behandlung nach der S-Phase führt erst in der übernächsten Mitose zu Aberrationen.

PRESTON (1980; 1982a,b) und PRESTON und GOOCH (1981) vertreten die Meinung, daß die Klassifizierung chemischer Mutagene in S-Phase-unabhängig und S-Phase-abhängig eine unzulässige Vereinfachung darstellt und somit nicht mehr haltbar ist. Auf Prestons Artikel wird zu einem späteren Zeitpunkt (s.S.15) im Zusammenhang mit den Aberrationsmodellen eingegangen.

In Folgenden werden die Primärläsionen beschrieben, die durch Behandlung mit verschiedenen Mutagenen induziert werden. Im Anschluß daran wird die Umwandlung durch Reparaturvorgänge in Sekundärläsionen und die daraus resultierenden Veränderungen an den Metaphasechromosomen behandelt.

Ionisierende Strahlen gehören zu den S-Phase-unabhängigen Mutagenen, sie induzieren Einzelstrangbrüche und Doppelstrangbrüche in den Phosphodiesterbindungen der DNA, sowie Basenschäden (DEAN et al. 1969; BLOK und LOMAN 1973; ROTI und CERUTTI 1974; HARIHARAN et al. 1975; STRNISTE und WALLACE 1975; PRESTON 1980). Schwach ionisierende Strahlung hat Einzelstrangbrüche und Doppelstrangbrüche im Verhältnis von 10-20 zu eins zur Folge (FREIFELDER 1966; CORRY und COLE 1968; NEARY et al. 1970). Bei stark ionisierender Strahlung überwiegen die Doppelstrangbrüche (NEARY et al. 1972; NATARAJAN 1976). Außerdem wurden nach Röntgenbestrahlung DNA-Protein cross-links gefunden (FORNACE und LITTLE 1977; FORNACE et al. 1980).

Bleomycin (BLM), ein cytostatisch wirksames Antibiotikum aus Streptomyces verticillus gehört zu den wenigen S-Phase-unabhängig wirkenden Chemikalien. BLM induziert als Primärläsion hauptsächlich DNA-Einzelstrangbrüche (SUZUKI et al. 1970; MIRABELLI et al. 1980). KUO und HAIDLE (1973) fanden, daß sowohl Phosphodiester-Bindungen, als auch der Desoxyribose-Anteil der DNA durch BLM angegriffen wird. Wird iso-

lierte DNA mit hohen Dosen BLM behandelt, lassen sich mit biochemischen Methoden auch DNA-Doppelstrangbrüche nachweisen. Diese Doppelstrangbrüche werden als zwei voneinander unabhängige Einzelstrangbrüche an gegenüberliegenden Stellen der DNA gedeutet (MIYAKI et al. 1975; D'ANDREA und HASELTINE 1978). Eine weitere Wirkung von BLM ist das Freisetzen von Basen (HAIDLE et al. 1972; MÜLLER et al. 1972).

Zu den wichtigsten S-Phase-abhängigen Mutagenen gehören UV-Licht und alkylierende Agenzien. In vitro Untersuchungen von SMITH (1966) und SETLOW (1968) haben gezeigt, daß Behandlung von DNA mit UV-Licht eine Vielzahl verschiedener Primärläsionen zur Folge hat. Es wurden Pyrimidin-Dimere, DNA-Protein cross-links, inter- und intrasträngige DNA cross-links und Einzelstrangbrüche gefunden. Die größte biologische Bedeutung haben Pyrimidin-Dimere, die zwischen zwei benachbarten Basen eines DNA-Stranges gebildet werden (AUERBACH 1976). Thymin-Thymin Dimere entstehen häufiger als Cytosin-Cytosin und Cytosin-Thymin Dimere. Durch Anhäufung dieser Dimere kann es zu Konformationsänderungen der DNA kommen, was einsträngige Regionen zur Folge hat (SHAFRANOVSKAYA et al. 1973; KATO und FRASER 1973). Eine weitere wichtige Primärläsion sind DNA-Protein cross-links, die von HAN et al. (1975), FORNACE und KOHN (1976) und SMITH (1976) beschrieben wurden.

Alkylierende Agenzien sind die wichtigste Gruppe chemischer Mutagene, die sowohl Genmutationen, als auch strukturelle Aberrationen induzieren. Von allen Chemomutagenen ist bei diesen Substanzen die Induktion der Primärläsion am besten bekannt. Die Wirksamkeit alkylierender Agenzien ist abhängig von der Anzahl der funktionellen Gruppen, der Affinität zum nucleophilen Reaktionspartner und letztendlich auch von der Molekülgröße. Die DNA kann an ihren Phosphatgruppen alkyliert werden, der so entstandene Triester ist instabil und spaltet eine oder mehrere Alkylgruppen ab (LAWLEY 1974). Außerdem kann durch die Alkylierung die Zucker-Phosphat-Bindung gelöst werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Alkylierung von Purinen und Pyrimidinen. Obwohl 15 verschiedene nucleophile Angriffspunkte an den Basen der DNA existieren, sind nur wenige auf Grund sterischer Faktoren einer Alkylierung zugänglich. Die O-6 und N-7 Positionen vom Guanin sind die bevorzugten Angriffspunkte alkylierender Agenzien (LAWLEY und BROOKES 1963; SINGER 1975; LAWLEY et al. 1975).

Es ist üblich die alkylierenden Agenzien in zwei Hauptgruppen einzuteilen: die monofunktionellen und die polyfunktionellen. Monofunktio-

nelle Alkylantien induzieren als Primärläsion hauptsächlich alkylierte Purine, die zu Einzelstrangbrüchen werden können. Behandlung mit polyfunktionellen Alkylantien hat in erster Linie cross-links zur Folge. Diese cross-links können in einem DNA-Strang ("intrasträngig") oder zwischen den beiden Strängen der Doppelhelix gebildet werden ("intersträngig"), wobei ein direkter Zusammenhang mit der Molekülgröße besteht. Die Fähigkeit cross-links zu bilden ist eine Ursache dafür, daß polyfunktionelle alkylierende Agenzien stärkere Mutagene sind als monofunktionelle.

Obwohl Röntgenstrahlen, Bleomycin, UV-Licht und alkylierende Agenzien verschiedene Primärläsionen induzieren, sind die morphologischen Veränderungen an den Metaphasechromosomen gleich. Somit ist die Aberrationsentstehung nicht allein durch das direkte Einwirken von Mutagenen auf die DNA zu erklären. Chromosomale Aberrationen sind das Ergebnis zellulärer Reaktionen auf eine Primärläsion. Durch fehlerhafte Reparatur können die Primärläsionen in strukturelle Aberrationen überführt werden.

Fast alle DNA-Einzelstrangbrüche werden von der Zelle umgehend und fehlerfrei repariert (SETLOW und SETLOW 1972). SOGNIER und HITTELMANN (1979) konnten 2 Minuten nach Behandlung von CHO-Zellen mit Bleomycin Reparaturvorgänge nachweisen, wobei die Reparatur schon nach 15 Minuten weitgehend abgeschlossen war. SAITO und ANDOH (1973) fanden, daß 3 Stunden nach Behandlung von Mäusefibroblasten mit Bleomycin alle Einzelstrangbrüche repariert waren. Nach Röntgenbestrahlung konnten ähnliche Befunde erhoben werden. VAN DER SCHANS (1982) bestrahlte verschiedene Zellkulturen (CHO, menschliche Fibroblasten, ataxia telangiectasia) mit mittleren und hohen Dosen (20-150Gy) und fand eine schnelle und eine langsame Reparatur von Einzelstrangbrüchen, ein Befund der durch Reparatur von zwei unterschiedlichen Läsionstypen gedeutet wird.

Lange Zeit wurde angenommen, daß Doppelstrangbrüche nicht repariert werden können. CORRY und COLE (1968) konnten nachweisen, daß nach niedrigen Bestrahlungsdosen 80-100% aller Doppelstrangbrüche repariert werden. Untersuchungen an röntgenbestrahlten Ehrlich Ascites Tumorzellen (BLÜCHER und POHLIT 1982; BRYANT und BLÜCHER 1982; ILIAKIS et al. 1982) zeigten, daß ein Großteil der induzierten Doppelstrangbrüche repariert wird. Nach Behandlung von Mäusefibroblasten mit Bleomycin wur-

den vergleichbare Ergebnisse gefunden (SAITO und ANDOH 1973).

Es kann als gesichert gelten, daß nur ein Bruchteil der induzierten Primärläsionen an der Aberrationsentstehung beteiligt sind. Wahrscheinlich können einige Doppelstrangbrüche von der Zelle nicht fehlerfrei repariert werden, die dann für die Entstehung chromosomaler Aberrationen verantwortlich sind (AHNSTRÖM 1982).

Bis jetzt wurden durch Mutagenbehandlung in der DNA induzierte Primärläsionen, ihre Reparatur oder ihre Umwandlung in Sekundärläsionen beschrieben. Für die Manifestierung chromosomaler Aberrationen wurden von EVANS (1977) zwei Postulate aufgestellt: Bei Behandlung mit direkt chromosomenbrechenden Agenzien, wie Röntgenstrahlen und Bleomycin, erfolgt die Aberrationsmanifestierung durch Reparaturfehler ("mis-repair"). Bei UV-Licht und alkylierenden Agenzien dagegen ist stets eine S-Phase für die Manifestierung chromosomaler Aberrationen notwendig ("mis-replication").

Die Vielzahl von Parametern, wie verschiedene chemische Reaktivität von Mutagenen, ihre Aktivierung und Metabolisierung im Organismus, Wechselwirkungen mit der DNA und mit DNA assoziierten Proteinen, Einfluß von Reparaturprozessen und DNA-Synthese, bedingt eine sehr komplexe Situation. Bis jetzt konnte noch nicht eindeutig geklärt werden, ob letztendlich alle Primärläsionen in ein und dieselbe Sekundärläsion - etwa den DNA-Doppelstrangbruch - überführt werden, oder ob verschiedene Sekundärläsionen an der Aberrationsmanifestierung beteiligt sind. Somit sind alle Modelle zur Aberrationsentstehung immer noch hypothetischer Natur, die jedes für sich durch eine Reihe von indirekten Beweisen gestützt werden. Ein direkter Beweis für die Richtigkeit des Aberrationsmodells von BENDER konnte von NATARAJAN und OBE (1978) erbracht werden. Im folgenden werden die wichtigsten Modelle zur Aberrationsentstehung mit einigen Beweisen und Gegenbeweisen aufgeführt.

Es gibt zwei grundsätzlich verschiedene Modelle zur Entstehung chromosomaler Aberrationen, die Bruch-Reunions-Hypothese von SAX und die Austauschhypothese von REVELL. Beide Modelle wurden entwickelt, ohne daß der genaue Aufbau der DNA bekannt war. BENDER's Modell zur Aberrationsentstehung ist eine Weiterentwicklung der Bruch-Reunions-Hypothese, wobei BENDER die neuen Erkenntnisse über den molekularen Aufbau der DNA mitberücksichtigt.

SAX (1940; 1941) behandelte *Tradescantia* Microsporen mit Röntgenstrahlen und stellte an Hand dieser experimentellen Daten folgende Postulate auf:

- (1) Röntgenstrahlen induzieren Chromatiden- und Chromosomenbrüche.
- (2) Verheilen die Bruchenden ("restitution"), führt dies zu ungeschädigten Chromosomen in der Metaphase. Der Großteil der Brüche unterliegt der Restitution.
- (3) Bruchenden, die nicht verheilen, bleiben offen und erscheinen in der Mitose als Chromatiden- oder Chromosomenbruch.
- (4) Verheilen Bruchenden verschiedener Chromosomen miteinander ("illegitimate fusion"), führt dies zu Austauschaberrationen.
- (5) Chromatidenaberrationen entstehen durch Bestrahlung in der G2- oder späten S-Phase des Zellzyklus. Chromosomenaberrationen entstehen durch Bestrahlung von Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus.

Nach der Bruch-Reunions-Hypothese sind Austauschaberrationen seltene Ereignisse, während Chromatidbrüche die häufigste Aberrationsform darstellen. Verschiedene Autoren (NEARY und EVANS 1958; REVELL 1959; 1966; EVANS 1962; SCOTT und EVANS 1967) fanden, daß Chromatidbrüche in röntgenbestrahlten Pflanzenzellen relativ selten vorkommen. Als Erklärung wird vermutet, daß Autoren, die hohe Raten an Chromatidbrüchen fanden, auch achromatische Läsionen in ihre Daten miteinbezogen haben. Das überproportionale Auftreten von Austauschaberrationen war mit der von Sax entwickelten Bruch-Reunions-Hypothese nur noch schwer zu erklären und bildete die Voraussetzung für Revells Austauschhypothese.

REVELL (1959; 1966) bestrahlte *Vicia faba* in der G2-Phase des Zellzyklus und formulierte an Hand der Ergebnisse seine Austauschhypothese:

- (1) Die Primärläsion ist nicht ein Chromatid- oder Chromosomenbruch, sondern nur eine lokale Instabilität im Chromosom.
- (2) Diese Instabilität kann sich zu dem ursprünglichen Zustand zurückentwickeln, woraus ein ungeschädigtes Metaphasechromosom resultiert.
- (3) Wenn zwei Primärläsionen zeitlich und räumlich dicht genug beieinander liegen, ist die Voraussetzung für ein Austauschereignis gegeben ("exchange initiation"). In diesem Zustand können die Chromosomen für längere Zeit verbleiben.

- (4) Alle Arten von Chromatidenaberrationen resultieren aus Austauschprozessen, entweder aus vollständigen oder unvollständigen.
- (5) Chromatidbrüche sind das Ergebnis von unvollständigen Chromatidenaustauschen ("intrachanges").

Ein Isochromatidbruch ist nach Revells Austauschmodell einer von vier möglichen "intrachanges". Nach diesem Modell müssen Chromatidbrüche und Isochromatidbrüche im Verhältnis von 5:2 auftreten. EVANS und SCOTT (1969) und NEARY und SAVAGE (1966) konnten dieses Verhältnis an Pflanzenzellen bestätigen. Nach Neutronenbestrahlung wurde allerdings ein abweichendes Verhältnis gefunden, wobei die Isochromatidbrüche überproportional vertreten waren (SAVAGE et al. 1968). Die Fragmentierung von Chromosomen ist ebenfalls nicht mit der Austauschhypothese zu erklären. Chromosomenfragmentierung kommt sowohl in Pflanzen- als auch in Säugerzellen nach Behandlung mit DNA-Synthese Hemmern wie Hydroxyurea vor (OPPENHEIM und FISHBEIN 1965; KIHLMAN et al. 1966; TIMSON 1975). Nach Revells Hypothese entstehen Chromatidbrüche aus unvollständigen "intrachanges", damit sollten ca. 40% aller Bruchstellen von Schwesterchromatidenaustauschen (SCE) begleitet sein. UEDA et al. (1976) fanden in Knochenmarkszellen der Ratte nach 7-12-Dimethylbenz(a)Anthrazen (DMBA) Behandlung in den Chromosomen 1 und 2 an bestimmten Genloci ("hot spots") gehäuft Brüche und SCE's. Dies wurde als indirekter Beweis für Revells Modellvorstellungen gedeutet. VAN KESTEREN-VAN LEEUWEN und NATARAJAN (1980) konnten zeigen, daß in den Chromosomen 1 und 2 von Knochenmarkszellen der Ratte nach DMBA-Behandlung 46,9% der Brüche von SCE's begleitet waren. Dieser Beweis für die Hypothese von Revell wird von den Autoren aber dahingehend eingeschränkt, daß die Brüche im stark kondensierten Heterochromatin lokalisiert waren, das sehr empfindlich auf Mutagenbehandlung reagiert. Revells Arbeiten wurden mit *Vicia faba* durchgeführt, die ebenfalls große heterochromatische Chromosomenbereiche enthält. Eine Korrelation von Brüchen und SCE in euchromatischen Regionen konnte noch nicht gezeigt werden. GALLOWAY und WOLFF (1979) fanden, daß nur 25% der Bruchstellen nach DMBA-Behandlung mit SCE korreliert waren. Diese Ergebnisse werden dahingehend gedeutet, daß Brüche und SCE an voneinander unabhängigen Stellen in den Chromosomen entstehen, was Revells Theorie widerlegen würde.

Die genannten Beweise und Gegenbeweise weisen darauf hin, daß höchstens ein Teil der strukturellen Aberrationen ihre Ursache in den von Re-

voll beschriebenen Austauschprozessen haben können. Will man dieses Modell nicht ganz verwerfen, müssen zusätzlich noch andere Mechanismen der Aberrationsentstehung als Erklärung zu Hilfe genommen werden, um alle experimentellen Daten zu interpretieren.

Das Modell zur Entstehung chromosomaler Aberrationen von BENDER et al. (1973a,b,) basiert auf Ergebnissen an UV-bestrahlten CHO-Zellen. Kurze Zeit später (BENDER et al. 1974) wurde seine Gültigkeit auch auf Aberrationen übertragen, die durch ionisierende Strahlung und Chemikalien induziert werden. Die Grundgedanken sind Folgende:

- (1) Das eukaryote Chromosom besteht in der G1-Phase des Zellzyklus aus einer durchgehenden DNA-Doppelhelix.
- (2) Angriffspunkt für alle Mutagene ist die DNA. Ob direkt oder indirekt entstanden, nur Veränderungen an der DNA können zu chromosomalen Aberrationen führen.
- (3) Primärläsionen sind entweder Brüche in der Polynucleotidkette oder Basenschäden, die durch semikonservative DNA-Replikation oder enzymatische Reparaturprozesse in Strangbrüche überführt werden.
- (4) Aberrationen haben ihre Ursache in nicht reparierten Doppelstrangbrüchen und Rekombination zwischen den Bruchenden. Doppelstrangbrüche können entweder direkt induziert werden oder indirekt im Verlauf der DNA-Synthese entstehen.
- (5) Nichtreparierte Einzelstrangbrüche erscheinen in der Metaphase als achromatische Läsionen.

Das von Bender entworfene Modell weist DNA-Doppelstrangbrüchen eine zentrale Bedeutung bei der Aberrationsentstehung zu, unabhängig davon ob sie direkt induziert werden, oder erst indirekt durch DNA-Synthese und enzymatische Reparaturprozesse entstehen. Voraussetzung für das indirekte Entstehen von Doppelstrangbrüchen ist die Existenz von einzelstrangspezifischen Endonucleasen. Eine derartige Endonuclease konnte bis jetzt nur von SLOR und LEV (1973) in eukaryoten Zellen nachgewiesen werden. Als indirekter Beweis für die Theorie von Bender läßt sich das Verhältnis von Chromatiden- zu Chromosomenaberrationen nach einer Röntgenbestrahlung anführen. Röntgenstrahlen induzieren direkt Doppelstrangbrüche, dies führt bei Bestrahlung in der G1-Phase des Zellzyklus zu Chromosomenaberrationen, in der G2-Phase zu Chromatidenaberrationen und in der S-Phase zu Chromosomen- und Chromatidenaberrationen. Ferner sprechen die Experimente mit Xenopus Zellen

von GRIGGS und BENDER (1973) und VAN ZEELAND et al. (1980) für die Richtigkeit des Modells. Es konnte gezeigt werden, daß alle Läsionen, die nach UV-Bestrahlung zu chromosomalen Aberrationen führen, durch Photoreaktivierung repariert werden können. Somit konnte ein direkter Zusammenhang zwischen DNA-Reparatur und strukturellen Aberrationen hergestellt werden.

Eine weitere Erklärung für die molekularen Mechanismen der Aberrationsentstehung liefern die experimentellen Daten von PRESTON (1980;1982a,b), PRESTON und GOOCH (1981). Es wurden von den Autoren folgende Grundgedanken formuliert:

- (1) Chromosomale Aberrationen entstehen nicht direkt als Folge induzierter Doppelstrangbrüche.
- (2) Chromosomale Aberrationen entstehen nur durch Reparaturprozesse.
- (3) Die Einteilung von Mutagenen in S-Phase abhängig und unabhängig ist nicht zulässig.

Zu (1) und (2): Aberrationen und vielfach auch das Vorkommen bestimmter Aberrationstypen (z.B. Chromatiden- und Chromosomenaberrationen) haben ihre Ursache in verschiedenen Reparaturkapazitäten. Menschliche Lymphozyten wurden in G₀ bestrahlt und für 1,2 und 3 Stunden mit Cytosin Arabinosid (AraC) inkubiert. AraC verhindert eine vollständige Excisionsreparatur und führt zur Anhäufung von Einzelstrangbrüchen. Zugabe von Deoxycytidin kann diese Reparaturhemmung wieder aufheben, was zur Folge hat, daß die Einzelstrangbrüche jetzt in Aberrationen überführt werden können. Wenn Einzelstrangbrüche an der Aberrationsentstehung beteiligt sind, müßte die Aberrationsrate nach AraC Behandlung höher liegen als in den bestrahlten Vergleichskulturen. Es wurde ein linearer Anstieg der Rate der Dizentrischen- und Ringchromosomen, sowie der Chromosomenbrüche gefunden, was auf eine fortwährende Bildung von Einzelstrangbrüchen während der AraC Inkubation zurückgeführt wird. Dieses Ergebnis spricht gegen direkt induzierte Einzel- und Doppelstrangbrüche als Hauptursache von Chromosomenaberrationen.

Wurden die Lymphozyten in der G₂-Phase des Zellzyklus bestrahlt und anschließend für 2 bzw. 3 Stunden mit AraC inkubiert, wurde ein Anstieg der Chromatid- und Isochromatidbrüche gefunden. Translokationen wurden in den AraC behandelten Kulturen nicht beobachtet. Der Anstieg bei den Brüchen wird durch eine Anhäufung von Einzelstrangbrüchen, hervorgerufen durch AraC, und deren Umwandlung durch eine zelleigene Nuclease in Doppelstrangbrüche erklärt. Außerdem verhindert AraC alle Reparaturvorgänge, die zu Austauschaberrationen führen.

Zu (3): Lymphozyten wurden mit Methylmethansulfonat (MMS) oder 4-Nitro-quinolin-Oxid (4NQO) in der G1-Phase des Zellzyklus behandelt und anschließend für 6 Stunden mit AraC inkubiert. Dies hatte einen signifikanten Anstieg der Chromosomenaberrationen zur Folge. Das Auftreten von Chromosomenaberrationen nach G1-Behandlung mit diesen Chemikalien ist unerwartet und wird folgendermaßen erklärt: Durch MMS und 4NQO induzierte Schäden können nur langsam repariert werden. Als Folge davon treten normalerweise viele Zellen mit unreparierten Schäden in die S-Phase ein. Infolge der DNA-Replikation oder einer postreplikativen Reparatur entstehen aus diesen Schäden dann Chromatidenaberrationen. AraC Behandlung häuft Einzelstrangbrüche an, die somit an der Aberrationsentstehung beteiligt sein müssen.

Nach einer Röntgenbestrahlung oder Behandlung mit Bleomycin dagegen erfolgt eine schnelle Reparatur der induzierten Schäden. Die Wahrscheinlichkeit, daß durch Reparatur entstandene Läsionen räumlich und zeitlich dicht genug für eine Interaktion beieinander liegen, ist deshalb wesentlich größer. Wegen der schnellen Reparatur bleiben nur wenige Schäden bis zur S-Phase bestehen, was die geringe Anzahl an Chromatidenaberrationen nach Bestrahlung in G0 und G1 erklärt.

Die aufgeführten Modelle verdeutlichen, daß die molekularen Mechanismen der Aberrationsentstehung immer noch unklar sind. Behandlung von proliferierenden Zellen mit Enzymen, die eine definierte Wirkung auf die DNA haben, ist eine weitere Möglichkeit Klarheit über die an der Aberrationsentstehung beteiligten Läsionen zu erlangen. TANAKA et al. gelang es als ersten, mit Hilfe von inaktiviertem Sendai Virus, T4-Endonuclease in Xeroderma pigmentosum Zellen einzubringen. Xeroderma pigmentosum Zellen sind nicht in der Lage UV-induzierte Schäden durch Excisionsreparatur zu beheben. T4-Endonuclease ersetzt das fehlende Enzym, was zu einer vollständigen Reparatur führt, die an Hand von DNA-Synthese nach UV-Bestrahlung nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse waren die Voraussetzung für die folgenden Versuche. Es sollte eine einzelstrangspezifische Endonuclease in lebende Zellen eingebracht werden, um nachzuweisen, daß Doppelstrangbrüche die direkte Ursache chromosomaler Aberrationen sind. Notwendige Voraussetzung ist, daß die DNA entweder direkt induzierte oder durch Reparaturprozesse entstandene Einzelstrangbrüche enthält. Einige dieser einsträngigen DNA-Regionen werden von Neurospora Endonuclease erkannt und in Doppelstrangbrüche überführt. Diese zusätzlich entstan-

denen Doppelstrangbrüche müßten in der nächsten Mitose die Rate der strukturellen Aberrationen erhöhen.

NATARAJAN und OBE (1978); NATARAJAN et al. (1980); OBE und NATARAJAN (1980) und OBE et al. (1982) und NATARAJAN und ZWANENBURG (1982) haben CHO-Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus mit Röntgenstrahlen behandelt und anschließend mit inaktiviertem Sendai Virus und Neurospora Endonuclease (NE) nachbehandelt. Der Virus sollte die Zellen für die relativ großen Enzymmoleküle permeabilisieren, ohne dabei Schäden an der DNA zu induzieren. In ersten Mitosen nach Kulturansatz wurden die Chromosomen auf strukturelle Aberrationen ausgewertet. Durch die Nachbehandlung mit NE wurde die Rate der achromatischen Läsionen, der Chromatidbrüche und der Chromatidentranslokationen mindestens verdoppelt. Die Ergebnisse werden von den Autoren dahingehend gedeutet, daß einige von den strahleninduzierten Einzelstrangbrüchen durch das Enzym in Doppelstrangbrüche überführt wurden. Ähnliche Ergebnisse konnten nach Behandlung mit Bleomycin und Methylmethansulfonat gefunden werden. Wurden die Zellen dagegen mit UV-Licht oder Mitomycin behandelt, konnte durch die NE-Nachbehandlung nur die Rate der achromatischen Läsionen gesteigert werden. Chromatidenaberrationen blieben durch die NE-Zugabe unbeeinflusst.

In weiteren Experimenten sollte geklärt werden, wie lange Röntgenstrahlen induzierte Einzelstrangbrüche in der G2-Phase in Doppelstrangbrüche überführt werden können. Sofortige Nachbehandlung führte wieder zu einem deutlichen Anstieg der achromatischen Läsionen, der Chromatidbrüche und der Translokationen. Nachbehandlung 60 oder 90 Minuten nach der Bestrahlung erhöhte nur noch die Rate der Chromatidbrüche, die Rate der Translokationen blieb unbeeinflusst. Es wird angenommen, daß durch sterische Veränderungen in den Chromosomen der späten G2-Phase keine Austauschaberrationen mehr gebildet werden können.

Nach Röntgenbestrahlung von CHO-Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus konnte durch die NE-Nachbehandlung sowohl die Rate der Chromatiden- als auch Chromosomenaberrationen gesteigert werden. Der Anstieg der Chromosomenaberrationen wird durch die Umwandlung von Einzelstrangbrüchen in Doppelstrangbrüche erklärt, während der Anstieg der Chromatidenaberrationen durch Umwandlung von Basenschäden in Einzelstrangbrüche gedeutet wird.

Zusätzlich zu den cytologischen Daten konnte für röntgenbestrahlte Zellen biochemisch durch neutrale Sucrose Zentrifugation die Umwand-

lung von Einzelstrangbrüchen in Doppelstrangbrüche nachgewiesen werden.

Die chemischen Eigenschaften der verwendeten Endonuclease aus *Neurospora crassa* wurden von LINN und LEHMAN (1965a,b) wie folgt beschrieben: Das Enzym greift sowohl denaturierte DNA als auch einsträngige RNA an. Die Enzymaktivität mit intakter DNA als Substrat ist nur 2% der Aktivität mit denaturierter DNA als Substrat. PH-Wert, Ionenkonzentrationen und Temperatur während der Behandlung haben einen starken Einfluß auf den Wirkungsgrad des Enzyms. Bei pH-Werten zwischen 7,5 und 8,5 liegt eine optimale Aktivität vor, aber auch in dem erweiterten Bereich von 5,8 bis 9,3 konnte noch eine zufriedenstellende Aktivität gemessen werden.

Zweiwertige Kationen, wie Ca^{++} , Mg^{++} , oder Fe^{++} , in einer Konzentration von 0,01M steigern die Aktivität auf das zwei- bis dreifache. Bei Zugabe von 0,01M Kaliumphosphat sinkt die Enzymaktivität bis auf die Hälfte, bei einer Konzentration von 0,1M war keine Aktivität mehr feststellbar.

Auch die Temperatur während der Inkubation hat einen Einfluß auf den Wirkungsgrad. Bei einer Temperatur von 47°C - 62°C konnte eine maximale Aktivität festgestellt werden. Tiefer und höhere Temperaturen führten zu einer deutlichen Reduzierung. Bei 37°C sind es nur noch knapp 30% und bei 20°C noch 1% der maximalen Aktivität.

Die Hydrolyse denaturierter DNA steigt bis 60% linear an und geht dann bis 98% in eine Sättigungskurve über. Schon nach 30 Minuten Inkubationszeit ist 35%, nach 60 Minuten 65% der DNA hydrolysiert.

Das Enzym greift bevorzugt Diesterbindungen mit Guanin Resten in einem Polynucleotid an. Während des ersten Stadiums der Hydrolyse wird Deoxyguanosin-5-Phosphat dreimal häufiger gespalten als die drei anderen Nucleotide zusammen.

Die genannten Ergebnisse wurden hauptsächlich an hitzedenaturierter DNA von *E. coli* gewonnen. Außerdem wurden Untersuchungen an der DNA von Lachsspermien, Kalbsthymus und den Phagen T4 und T7 durchgeführt, die alle vergleichbare Ergebnisse erbrachten.

Das Enzym wirkt unter einer Vielzahl von Bedingungen, wie z.B. über einen großen pH-Bereich, mit und ohne Zugabe von zweiwertigen Kationen und verschiedenen Temperaturen und scheint deshalb geeignet für Experimente mit CHO-Zellen und menschlichen Lymphozyten.

In der vorliegenden Arbeit wurden CHO-Zellen und menschliche Lymphozyten in vitro zu verschiedenen Zeiten des Zellzyklus mit Mutagenen behandelt. Anschließend erfolgte eine Nachbehandlung mit NE. Die Auswertung erfolgte in ersten Mitosen nach Kulturansatz auf strukturelle Aberrationen. In einigen Kulturen wurden zweite Mitosen auf SCE ausgewertet. Die Experimente wurden unter folgenden Gesichtspunkten durchgeführt:

- (1) Behandlung von CHO-Zellen mit einer Batterie von Referenzmutagenen in G1 und G2 mit der von NATARAJAN und OBE (1978) entwickelten Methode.
- (2) Erarbeiten einer entsprechenden Methode für menschliche Lymphozyten.
- (3) Nachweis von Mutagenen, die DNA-Einzelstrangbrüche induzieren.
- (4) Sensitivierung des Lymphozyten-Testsystems durch NE-Zugabe nach der Mutagenbehandlung.
- (5) Überprüfung aller gängigen Aberrationsmodelle an Hand der experimentellen Daten.
- (6) Die Rolle von DNA-Doppelstrangbrüchen als direkte Ursache von strukturellen Aberrationen.
- (7) Einfluß einer NE-Nachbehandlung auf die mutageninduzierte SCE-Rate.

TESTSUBSTANZEN

In der vorliegenden Arbeit wurden CHO-Zellen und menschliche Lymphozyten mit 16 verschiedenen Chemikalien behandelt und anschließend mit NE nachbehandelt. Es werden chemische Eigenschaften und wichtige Befunde aus der Mutationstestung beschrieben. Die Substanzen wurden in folgende Gruppen eingeteilt:

1. Monofunktionelle alkylierende Agenzien

- 1.1. Dimethylsulfat (DMS)
- 1.2. Ethylmethansulfonat (EMS)
- 1.3. Methylmethansulfonat (MMS)
- 1.4. Ethylnitrosourea (ENU)
- 1.5. Methylnitrosourea (MNU)
- 1.6. Methyl-Nitro-Nitroso-Guanidin (MNNG)

2. Polyfunktionelle alkylierende Agenzien

- 2.1. Diepoxybutan (DEB)
- 2.2. Trenimon

3. Aldehyde

- 3.1. Acetaldehyd
- 3.2. Formaldehyd

4. Reparaturhemmer

- 4.1. Koffein

5. Hormone

- 5.1. Diethylstilbestrol (DES)

6. Zytostatika

- 6.1. Bleomycin (BLM)

7. Sonstige

- 7.1. Benzidin
- 7.2. Hydrazin-Sulfat
- 7.3. 4-Nitroquinolin-Oxid (4NQO)

1. Monofunktionelle alkylierende Agenzien

Alle in dieser Arbeit getesteten monofunktionellen Alkylantien wurden von VOGEL und NATARAJAN (1982) ausführlich beschrieben. Für weiterreichende Angaben, die über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen, wie Reaktivität mit der DNA und den Proteinen, Vergleiche von Mutagenität und Toxizität, Halbwertszeiten und Swain-Scott-Werte wird auf diese Übersichtsarbeit verwiesen.

1.1. Dimethylsulfat (MG 126,1)

DMS wird industriell und experimentell als methylierendes Agens genutzt. Industriell wurde es zur Herstellung von Farbstoffen verwendet. Die Toxizität ist hoch, die Aufnahme erfolgt sowohl durch die Haut, als auch durch die Atemwege (BROWNING 1965). DMS ist nach Injektion und Inhalation kanzerogen bei der Ratte (DRUCKREY et al. 1970).

Mutagenitätstests: Behandlung von DNA mit DMS hat hauptsächlich 7-Methylguanin als Alkylierungsprodukt zur Folge. Von größerer Bedeutung für die Mutagenität der Substanz scheint allerdings die Bildung von O-6 Alkylguanin zu sein (HOFFMANN 1980). Bei Salmonella konnten mit DMS sowohl Basenpaarsubstitutionen als auch Frameshiftmutationen induziert werden (SKOPEK et al. 1978). In vitro Testung ergab eine erhöhte Mutationsrate am HGPRT-Locus von CHO-Zellen (COUCH et al. 1978). Außerdem wurden nach DMS erhöhte SCE-Raten in menschlichen Fibroblasten gefunden (WOLFF et al. 1977). Untersuchungen über die Auswirkungen von DMS auf strukturelle Aberrationen wurden nur vereinzelt durchgeführt. In Ascitestumoren der Maus (SCHÖNEICH et al. 1970) und in CHO-Zellkulturen wurden erhöhte Raten an Chromatidenaberrationen gefunden (STURELID und KIHLMAN 1975).

1.2. Ethylmethansulfonat (MG 124,2)

EMS ist ein monofunktionelles alkylierendes Agens, dessen mutagene Wirkung hauptsächlich auf der Bildung von O-6 Äthylguanin beruht.

Mutagenitätstests: In E.coli konnte ein klarer Anstieg der Mutationsrate nach EMS-Behandlung gefunden werden. Im Knochenmark der Maus wurde nach in vivo Behandlung die SCE-Rate und die Anzahl der Micronuclei durch EMS erhöht. Chromatidenaberrationen wurden in Knochenmarkszellen und Spermatogonien nicht gefunden (AARON et al. 1980). Eine cytotoxische und mutagene Wirkung wurde von O'NEILL et al. (1979) im CHO/HGPRT-System gefunden. Behandlung von menschlichen Lymphozyten mit EMS führt zu einem dosisabhängigen Anstieg der SCE-Rate (KREPINSKY et al. 1979).

1.3. Methylmethansulfonat (MG 110,1)

MMS ist ein monofunktionelles alkylierendes Agens, das als Standardmutagen genutzt wird. Es methyliert die DNA hauptsächlich am N-7 und O-6 des Guanins und am N-3 des Adenins (OTSUI 1980).

Mutagenitätstests: Im Ames Test (Stamm TA100) ist MMS positiv (AMES et al. 1975; ROSIN und STICH 1978). In vitro Behandlung menschlicher Lymphozyten führt zu einem signifikanten Anstieg der SCE-Raten (HAGLUND und ZECH 1979; RAY und ALTENBURG 1978). Behandlung von Wurzelspitzen von *Vicia faba* mit MMS führt vermehrt zu Chromatidenaberrationen (VOGEL und NATARAJAN 1982). Über die Induktion von strukturellen Aberrationen durch MMS in Säugerzellen existieren nur wenige Daten. In dieser Arbeit wurden CHO-Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus mit MMS behandelt, was hohe Raten an strukturellen Aberrationen zur Folge hatte. In Lymphozytenkulturen dagegen können auch durch hohe MMS-Konzentrationen, unterhalb der cytotoxischen Grenze, nur maximal 10% aberrante Mitosen induziert werden.

1.4. Ethylnitrosourea (MG117,1)

ENU ist monofunktionell alkylierend und bildet mit der DNA in erster Linie O-6 Äthylguanin. Dieses Addukt ist instabil und die Ursache für DNA Strangbrüche (HEYTING et al. 1980).

Mutagenitätstests: In vivo Untersuchungen mit dem Specific Locus Test an der Maus ergaben, daß ENU das bei weitem stärkste Mutagen in diesem Testsystem ist (RUSSEL et al. 1979). In vitro Behandlung von CHO-Zellkulturen mit ENU führte zu einem Anstieg der SCE-Rate und einer erhöhten Mutationsrate in Bezug auf 8-Azaguanin Resistenz (CARRANO et al. 1978).

1.5. Methylnitrosourea

MNU ist ebenfalls ein starkes Mutagen, das mit der DNA hauptsächlich 6-Methylguanin Addukte bildet.

Mutagenitätstests: MNU ist mutagen bei *Salmonella* (TA 100 und TA 1535) und am HGPRT-Locus von CHO-Zellen (COUCH und HSIE 1978; GUTTENPLAN 1979). MNU-Behandlung induzierte in CHO-Zellen hohe Raten struktureller Aberrationen (ROBERTS und STURROCK 1973; ISHIDATE und ODASHIMA 1977).

1.6. Methyl-Nitro-Nitroso-Guanidin (MG 147,1)

Nitrosoverbindungen sind stark kanzerogene Alkylantien. Bevorzugter Angriffspunkt ist das N-7 und O-6 des Guanin. Im Unterschied zu anderen Nitrosoverbindungen, die in einer Reihe von Lebensmitteln vorkommen, wird MNNG nur experimentell als Standardkarzinogen und Mutagen verwendet (MONTESANO und BARTSCH 1975).

Mutagenitätstests: MNNG ist im Ames Test mit den Stämmen TA100 und TA 1535 mutagen (AMES et al. 1975; NEALE 1975). In vitro Behandlung von CHO-Zellkulturen mit MNNG führt zu einem dosisabhängigen Anstieg der SCE-Rate und der Rate struktureller Aberrationen (ISHIDATE und ODASHIMA 1977; POPESCU et al. 1979; RASKO et al. 1979). Eine Mutagenität von NNNG wurde auch im host-mediated assay, im Dominant-Letal-Test und so gut wie in allen Zellkulturen gefunden.

2. Polyfunktionelle alkylierende Agenzien

2.1. Diepoxibutan (MG 86,1)

DEB ist ein bifunktionelles alkylierendes Agens aus der Gruppe der Epoxide. Es alkyliert N-7 Atome des Guanins und bildet intersträngige cross-links (WHEELER 1965).

Mutagenitätstests: Im Salmonella Test ist DEB mit dem Stamm TA 100 mutagen (MC CANN et al. 1975; WADE et al. 1979). In vivo Untersuchungen an Maus und Ratte zeigten, daß DEB zu Hauttumoren führt (VAN DUUREN et al. 1966). In vitro Behandlung führt in Rattenleberzellen (DEAN und HODSON-WALKER 1979), menschlichen Lymphozyten und CHO-Zellkulturen (PERRY und EVANS 1975) zu einer deutlich gesteigerten Rate chromosomaler Aberrationen. In menschlichen Lymphozyten (OBE et al. 1982) und CHO-Zellkulturen (PERRY und EVANS 1975) konnten durch Behandlung mit DEB hohe SCE-Raten induziert werden.

2.2. Trenimon (MG 231,2)

Trenimon wurde erstmals 1958 bei Bayer synthetisiert und in der Folgezeit zur Chemotherapie des Krebses verwendet, speziell zur Behandlung von Hämoblastosen und malignen Tumoren (LINKE 1960). Wegen der geringen zytostatischen Selektivität wurde es bald durch andere Chemotherapeutika ersetzt. Heute wird es nur noch als Standardmutagen in der Mutationsforschung verwendet. Trenimon ist ein trifunktionelles alkylierendes Agens, das unter Öffnung der Äthylenimin-Ringe mit nucleophilen Resten wie -OH, -SH und NH_2 reagiert (OBE und BEEK 1979).

In Kalbsthymus DNA konnten Strangbrüche, Alkylierung von Purinen, Bildung von Oligonucleotiden und intersträngige cross-links gefunden werden (KLAMERTH und KÖPUN 1971).

Mutagenitätstests: Behandlung mit Trenimon induziert in Bakterien und Hefen Punktmutationen (OBE und BEEK 1979). Sowohl in vivo wie in vitro konnte eine Steigerung der SCE-Rate und der Rate struktureller Aberrationen durch Trenimon gefunden werden (BEEK und OBE 1975; BAUKNECHT et al. 1977). Weitere Befunde über die mutagene und kanzerogene Wirkung von Trenimon in den verschiedenen Testsystemen sind in der Übersichtsarbeit von OBE und BEEK (1979) diskutiert worden.

3. Aldehyde

3.1. Acetaldehyd (MG 44,1)

Acetaldehyd ist das primäre Oxidationsprodukt des Äthylalkohols. Die Metabolisierung zu Acetaldehyd erfolgt im Organismus hauptsächlich in der Leber (LIEBER 1976; ERIKSSON 1977). In isolierter DNA konnten RISTOW und OBE (1978) nach Behandlung mit Acetaldehyd cross-links nachweisen.

Mutagenitätstests: Bei Salmonella war keine mutagene Wirkung auf die Stämme TA 98 und TA 100 nachweisbar (SASAKI und ENDO 1978). Sowohl bei Mäusen, als auch beim Chinesischen Hamster wurde nach in vivo Verabreichung von Acetaldehyd eine Verdopplung der SCE-Rate in Knochenmarkzellen gefunden (OBE et al. 1979; KORTE et al 1981). Bei der in vitro Testung wurde sowohl in CHO-Zellkulturen, als auch in menschlichen Lymphozyten eine deutliche Erhöhung der SCE-Rate gefunden (OBE und BEEK 1979; RISTOW und OBE 1978). Strukturelle Aberrationen wurden in menschlichen Lymphozyten nach Behandlung mit Acetaldehyd nicht vermehrt gefunden. Werden dagegen Lymphozyten von Patienten mit Fanconi's Anämie mit Acetaldehyd behandelt, führt dies zu einem deutlichen Anstieg der Rate chromosomaler Aberrationen (OBE et al. 1979).

3.2. Formaldehyd (MG 30,0)

Formaldehyd wird als Konservierungsmittel verwendet und wird nur nach Kontamination im menschlichen Körper gefunden. FELDMAN (1973) konnte zeigen, daß Formaldehyd cross-links in der DNA induziert.

Mutagenitätstests: SASAKI und ENDO (1978) vermuten eine schwache Mutagenität im Ames Test (Stamm TA 100). Auch KÖLMARK (1953) konnte eine

schwach mutagene Wirkung von Formaldehyd auf *Neurospora crassa* nachweisen. Bei in vivo Verabreichung wurde Mutagenität bei *Drosophila* (AUERBACH et al. 1976) und im Dominant-Letal-Test bei der Maus (FONTIGNIE-HOUBRECHTS 1981) gefunden. Spermatocyten der Maus zeigten keine erhöhten Aberrationsraten nach Behandlung mit Formaldehyd (FONTIGNIE-HOUBRECHTS 1981). In vitro Behandlung von CHO-Zellkulturen und menschlichen Lymphozyten hatte eine dosisabhängige Erhöhung der SCE-Rate zur Folge (OBE und BEEK 1979). In dieser Arbeit wurden G1-Lymphozyten mit Formaldehyd behandelt, wobei keine erhöhte Rate struktureller Aberrationen gefunden wurde.

4. Reparaturhemmer

4.1. Koffein (MG 194,2)

Fast jeder Mensch dürfte koffeinhaltige Getränke konsumieren, was teilweise zu einer Koffeinkonzentration von $2,5 \times 10^{-5} \text{M}$ im Körper führt (AXELROD und REICHENTHAL 1953). Koffein wird im Körper schnell zu 1,7-Dimethylxanthin und 1-Methylxanthin metabolisiert (KIHLMAN 1974). Mutagenitätstests: Bei *E. coli* war nach Behandlung mit Koffein eine erhöhte Mutagenität nachweisbar (NOVICK und SZILLARD 1951). In hohen Konzentrationen (ca. 10^{-2}M) können in Säugerzellen durch Koffein in vitro vermehrt chromosomale Aberrationen induziert werden. Behandlung während der S-Phase führt bei CHO-Zellen und Lymphozyten zu Fragmentierung und Pulverisierung der Chromosomen in der Mitose (KIHLMAN et al. 1971; OSTERTAG und GREIF 1967). Neben diesem Effekt ist sicherlich die drastische Steigerung der Aberrationsrate beim Zusammenwirken mit UV-Licht und alkylierenden Agenzien am interessantesten (CREMER et al. 1980). Bei eukaryoten Zellen scheint die Steigerung der chromosomalen Aberrationen durch Nachbehandlung mit Koffein in der Hemmung der post-replikativen Reparatur begründet zu sein (KIHLMAN et al. 1974; SIVAK et al. 1982; GASCOIGNE et al. 1981). Pulsbehandlung von menschlichen G1-Lymphozyten mit Koffein hat keinen Einfluß auf die SCE-Rate, Dauerbehandlung führt zu einem dosisabhängigen SCE-Anstieg (TICE et al. 1982).

5. Hormone

5.1. Diethylstilbestrol (MG 268,3)

Bei Maus, Ratte und Hamster führte Verabreichung von DES zu einem vermehrten Krebsrisiko (MC LACHLAN et al. 1975; MC LACHLAN 1977).

Mutagenitätstests: Bei Salmonella konnte auch nach metabolischer Aktivierung kein mutagener Effekt von DES gefunden werden (GLATT et al. 1979). In vivo Behandlung mit DES führt in Knochenmarkzellen der Maus vermehrt zu strukturellen Aberrationen, nicht aber zu einer Erhöhung der SCE-Rate (IVETT und TICE 1981). In vitro Daten sind widersprüchlich. ISHIDATE und ODASHIMA (1977) und NATARAJAN und VAN KESTEREN - VAN LEEUWEN (1981) fanden keine Erhöhung chromosomaler Aberrationen durch DES. RÜDIGER et al. (1979) dagegen fanden erhöhte Aberrationsraten. RÜDIGER et al. (1979) und NATARAJAN und VAN KESTEREN-VAN LEEUWEN (1981) fanden erhöhte Aberrationsraten nach DES Behandlung in menschlichen Fibroblasten und CHO-Zellen. Außerdem wurden vermehrt aneuploide (RAO und ENGELBERG 1967) und polyploide Zellen in Kulturen des Chinesischen Hamsters und in HeLa-Zellen gefunden (ISHIDATE und ODASHIMA 1977; SAWADA und ISHIDATE 1978). RÜDIGER et al. (1979) konnten zeigen, daß zwei Metabolite des DES in stärkerem Maß die SCE-Rate erhöhen als die ursprüngliche Substanz.

6. Zytostatika

6.1. Bleomycin (MG 50000)

Durch BLM induzierte DNA-Läsionen wurden ausführlich in der Einleitung beschrieben. BLM wurde 1962 von Umezawa aus Streptomyces verticillus isoliert, und es wird seither als Zytostatikum verwendet. Die zytostatische Wirkung ist noch nicht eindeutig geklärt, dürfte aber mit den induzierten DNA-Strangbrüchen und einer spezifischen Proteinsynthesehemmung zusammenhängen.

Mutagenitätstests: Im Ames Test ist BLM bei allen Stämmen (TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537) negativ (BENEDICT et al. 1977). Bei Saccharomyces cerevisiae dagegen wurde eine deutliche mutagene Wirkung nachgewiesen (MOORE 1978). Therapeutische in vivo Verabreichung von BLM führt zu einer erhöhten Rate chromosomaler Aberrationen in den Lymphozyten (BORNSTEIN et al. 1971; SCHINZEL und SCHMID 1976). In vitro Studien mit menschlichen Lymphozyten zeigten, daß BLM in allen Zellzyklusstadien die Aberrationsrate deutlich steigert (DRESP et al. 1978). Auch

in CHO-Zellkulturen, Mäusefibroblasten und HeLa-Zellen wurden erhöhte Aberrationsraten nach Behandlung mit BLM gefunden (KIHLMAN et al. 1974; PAIKA und KRISHAN 1973). BLM ist ein S-Phase-unabhängiges Mutagen, auch durch hohe Dosen können nur wenige SCE induziert werden.

7. Sonstige

7.1. Benzidin (MG 184,2)

Bei Zugabe ins Kulturmedium fiel die Substanz in allen Konzentrationen sofort aus. Somit sind alle Konzentrationsangaben hinfällig und Aussagen über eine Wirksamkeit im NE-Testsystem stark eingeschränkt. Benzidin ist Grundstoff für eine Vielzahl von Farbstoffen und wird in großen Mengen technisch hergestellt.

Mutagenitätstests: Im Ames Test waren sowohl benzidinhaltige Farbstoffe (ELLIOTT und GREGORY 1980) als auch der Urin von behandelten Ratten mutagen (BOS et al. 1981). In vivo Behandlung von Mäusen führt in den Leberzellen zu einer Fragmentierung der DNA. Außerdem wirkt Benzidin bei Maus, Ratte und Hamster karzinogen. Überwiegend wurden Blasen- und Lebertumoren gefunden (BOYLAND et al. 1954; SELLAKUMAR et al. 1969). Schon in den vierziger Jahren wurde vermutet, daß beruflich mit Benzidin exponierte Personen gehäuft an Blasen- und Lebertumoren erkranken, nachgewiesen wurde es von GOLDWATER (1965). NATARAJAN und VAN KESTEREN-VAN LEEUWEN (1981) fanden nach in vitro Behandlung von CHO-Zellkulturen mit Benzidin einen Anstieg der SCE-Rate und der Rate chromosomaler Aberrationen.

7.2. Hydrazin-Sulfat (MG 130,1)

Behandlung mit Hydrazin-Sulfat führte in Mäusen vermehrt zu Tumoren (BHIDE et al. 1976). Daten zur Mutagenität liegen kaum vor. NATARAJAN und VAN KESTEREN-VAN LEEUWEN (1981) fanden keine SCE-Erhöhung nach Behandlung von CHO-Zellen mit Benzidin. Die Rate der strukturellen Aberrationen war dagegen deutlich erhöht.

7.3. 4-Nitroquinolin-Oxid (MG 190,2)

4-NQO verbindet sich mit der DNA hauptsächlich mit den Basen Adenin und Guanin (IKENAGA et al. 1977). Diese Addukte sind instabil und als Folge davon treten Einzelstrangbrüche auf (HORIKAWA et al. 1970; WALKER und SRIDHAR 1976). 4-NQO ist ein gut untersuchtes Standardmutagen, dessen Metabolismus in vivo vollständig bekannt ist.

Mutagenitätstests: Im Ames Test ist 4NQO positiv, sowohl bei der Induktion von Frameshiftmutationen, als auch Basensubstitutionen (AMES et al. 1975; MC COY et al. 1981). In vitro Behandlung von CHO-Zellkulturen mit 4NQO führt zu einer Steigerung der SCE-Rate und der Rate struktureller Aberrationen (ISHIDATE und ODASHIMA 1977; NATARAJAN und VAN KESTEREN-VAN LEEUWEN 1981).

MATERIAL UND METHODEN

Die folgende Zusammenstellung gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit bei der Lymphozyten-und Fibroblastenkultivierung verwendeten Methoden. Unter (3) wurden Methoden zusammengefaßt, die in beiden Testsystemen Verwendung fanden.

1. Lymphozytenkulturen

- 1.1. Kultivierung von Lymphozyten
- 1.2. Ansatz der Lymphozytenkulturen
 - 1.2.1. Vollblutkulturen
 - 1.2.2. Ansatz isolierter Lymphozyten
- 1.3. Mutagenbehandlung
- 1.4. Bestrahlung
 - 1.4.1. Bestrahlung von G0-Zellen
 - 1.4.2. Bestrahlung von G1-Zellen
 - 1.4.3. Bestrahlung von G2-Zellen
- 1.5. Enzymbehandlung
- 1.6. KCl-, PEG-und Virusbehandlung
- 1.7. Aufarbeiten

2. CHO-Zellkulturen

- 2.1. Kultivierung von CHO-Zellen
- 2.2. Ansatz von CHO-Kulturen
 - 2.2.1. Versuchsansatz für G2-Behandlungen
 - 2.2.2. Versuchsansatz für G1-Behandlungen
- 2.3. Mutagenbehandlung
- 2.4. Bestrahlung
- 2.5. Enzym-und Virusbehandlung
- 2.6. Versuchsplan
- 2.7. Aufarbeiten

3. Bei Lymphozyten und CHO-Zellen verwendete Methoden

- 3.1. Giemsa-Färbung
- 3.2. Differentielle Schwesterchromatiden-Färbung
- 3.3. Auswertung

4. Herkunft der Chemikalien

1. Lymphozytenkulturen

1.1. Kultivierung von Lymphozyten

2-Tage-Kulturen zur Auswertung auf strukturelle Aberrationen wurden nach der Mikroblutkulturmethode von DUDIN et al. (1974), 3-Tage-Kulturen zur Auswertung von Schwesterchromatidenaustauschen (SCE) in zweiten Mitosen nach der Methode von OBE et al. (1975) angesetzt.

Das periphere Venenblut stammte von einem 27-jährigen klinisch gesunden männlichen Probanden und wurde unmittelbar nach der Entnahme kultiviert. Zur Isolierung von Lymphozyten wurde Blut von Personen des Berliner Blutspendedienstes des Rudolf-Virchow-Krankenhauses verwendet.

1.2. Ansatz von Lymphozytenkulturen

1.2.1. Vollblutkulturen

Eine Vollblutkultur hatte folgende Zusammensetzung:

- 4,00 ml Ham's F10 Medium
- 0,50 ml Inaktiviertes fötales Kälberserum
- 0,12 ml Phytohämagglutinin (PHA)
- 0,02 ml Streptomycin-Penicillin-Gemisch
(1,0 mg Dihydrstreptomycin; 100 I.E. Penicillin)
- 0,40 ml Heparinisiertes peripheres Venenblut

Das fötale Kälberserum wurde nach dem Auftauen (Lagerung bei -20°C) für 30 Minuten bei 56°C im Wasserbad inaktiviert. Alle Kulturen wurden in sterilen Plastikröhrchen von 15 ml Volumen und 1,0 cm Durchmesser angesetzt und festverschlossen bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Jeweils 3-5 Stunden vor Ende der Inkubationszeit wurden 0,2 ml einer Colcemidlösung zugegeben (Endkonzentration in den Kulturen $0,08\text{ }\mu\text{g/ml}$). Die Kulturen wurden zweimal täglich aufgeschüttelt, um ein Verklumpen zu verhindern.

1.2.2. Ansatz isolierter Lymphozyten

Nach der Blutabnahme wurden die Lymphozyten durch eine Dichtegradienten Zentrifugation von den übrigen Blutbestandteilen getrennt. Die Isolierung der Lymphozyten umfaßte folgende Arbeitsgänge:

- (1) Mischen des Vollblutes mit Hank's Lösung im Verhältnis 1:1.
- (2) 3,0 ml Ficoll Trennmedium (Dichte 1,077) mit 5,0 ml Vollblut-Hank's Gemisch überschichten.
- (3) 30 Minuten bei $400\times g$ zentrifugieren, Lymphozytenring abheben und in 5,0 ml Hank's Lösung überführen.

(4) 10 Minuten zentrifugieren bei 200xg, Überstand abheben.

Waschvorgang 2x wiederholen.

Nach der Isolierung wurde die Zellzahl bestimmt und 1×10^6 Zellen pro Kultur eingegeben. Anschließend wurden die Lymphozyten mit Vollmedium unter Zugabe von 20% fötalem Kälberserum im CO_2 -Brutschrank (5% CO_2) inkubiert.

1.3. Mutagenbehandlung

Die Lymphozyten wurden zu unterschiedlichen Zeiten des Zellzyklus mit folgenden Mutagenen behandelt: Acetaldehyd, Bleomycin, Diepoxycutan, Formaldehyd, Methylmethansulfonat, Röntgenstrahlen und Trenimon. Bei einer G0-Behandlung wurde das Vollblut vor der Zugabe von PHA behandelt. Die G1-Behandlung erfolgte zur 20. Kulturstunde, die G2-Behandlung zur 45. Kulturstunde. Bei Dauerbehandlungen blieb das Mutagen bis zur Fixierung in den Kulturen. Bei Pulsbehandlungen wurde das Mutagen am Ende der Behandlungszeit ausgewaschen. Zum Auswaschen wurden die Zellen für 5 Minuten bei 200xg zentrifugiert, das Medium wurde abgehoben und das Sediment mit 5,0 ml vorgewärmter Hank's Lösung aufgenommen. Anschließend wurde wieder zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde anschließend mit NE oder vollständigem Kulturmedium versetzt.

1.4. Bestrahlung

1.4.1. Bestrahlung von G0-Zellen

Das Vollblut wurde mit einer PHILIPS Röntgenröhre in sterilen 2 ml Einwegspritzen bei 160 kV und 18,5 mA bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde das Blut einer Experimentalserie gemischt, um Unterschiede in den Bestrahlungsdosen auszugleichen, und mit NE versetzt. Wegen eines defekten Dosimeters konnte die Bestrahlungsdosis im Berliner Labor nicht exakt bestimmt werden, deshalb wurden die G1-Bestrahlungen in Leiden, Department of Radiation Genetics and Chemical Mutagenesis, durchgeführt.

1.4.2. Die Bestrahlung in Leiden erfolgte mit einer ENRAF Apparatur bei 150 kV und 6 mA. Die Dosisleistung lag bei 4 R/sec. In diesen Experimenten konnte die Bestrahlungsdosis exakt bestimmt werden und ist in den Tabellen im Ergebnisteil aufgeführt. Das Blut wurde bis zur Bestrahlung in 30 ml Glasflaschen kultiviert und in diesen bestrahlt. Anschließend wurden die Glasflaschen in Eis aufbewahrt und das Blut in Plastikröhrchen überführt. Es wurde für 5 Minuten zentrifugiert (200xg),

das Medium wurde abgehoben und die Zellen mit NE behandelt. Nach einer Behandlungszeit von 30 Minuten bei 37 °C wurde das Medium wieder zugegeben.

1.4.3. Bestrahlung von G2-Zellen

Bestrahlung, Enzymbehandlung und Überführen in Eis wurden entsprechend den G1-Experimenten durchgeführt. Unterschiedliche Erholungszeiten nach der Bestrahlung wurden erreicht, indem die Kulturen entweder sofort nach der Bestrahlung mit Enzym behandelt, oder vor der Enzymzugabe für 30, 60 oder 90 Minuten mit Kulturmedium bei 37 °C inkubiert wurden.

1.5. Enzymbehandlung

In allen Versuchen wurde eine Endonuclease von *Neurospora crassa* verwendet. Das Enzym lag in einer Suspension (3,2 mol/l und pH ca. 6) vor. Die spezifische Aktivität betrug 400-800 Einheiten/mg, mit denaturierter DNA als Substrat. Die NE-Behandlung wurde auf zwei unterschiedliche Arten durchgeführt: Bei der Nachbehandlung wurde das Enzym nach dem Auswaschen des Mutagens zugegeben. Bei der gleichzeitigen Behandlung wurden die Zellen gleichzeitig mit Enzym und Mutagen inkubiert. NE wurde immer auf das Zellsediment, ohne Kulturmedium, gegeben. Am Ende der Behandlungszeit wurde das Kulturmedium wieder zugegeben. Diese Verdünnung inaktiviert das Enzym und macht ein Auswaschen überflüssig.

1.6. KCl-, PEG- und Virusbehandlung

KCl, Polyäthylenglycoll (PEG) und Sendai Viren sollen die Permeabilität der Lymphozyten für die relativ großen Enzymmoleküle erhöhen. KCl wurde in aqua dest. gelöst. Von der Stammlösung (0,075 M) wurden 4,0 ml auf das Zellsediment gegeben. Am Ende der Behandlungszeit wurde zentrifugiert, der Überstand abgehoben und NE zugegeben.

PEG (MG 1400-1600) wurde in Medium gelöst und für 15 Minuten auf den Magnetrührer gestellt. Von der Stammlösung (2×10^{-1} M) wurden pro Kultur 100, 200 oder 300 µl auf das Sediment gegeben. Am Ende der Behandlungszeit wurde das Kulturmedium wieder zugegeben.

10000 I.E. inaktivierte Sendai Viren wurden in 8,0 ml Medium gelöst. Diese Stammlösung wurde bei -20 °C aufbewahrt. Die Viruszugabe erfolgte immer gleichzeitig mit dem Enzym auf das Zellsediment.

1.7. Aufarbeiten

Am Ende der Kulturzeit (50 Std. bzw. 72 Std.) wurden die Zellen wie folgt fixiert:

- (1) Aufschütteln, überführen in Zentrifugenröhrchen und für 10 Min. bei 200xg zentrifugieren, Überstand abheben.
- (2) Zugabe von 5,0 ml auf 37 °C erwärmter KCl-Lösung (0,075M) zum Sediment, 15 Min. bei Zimmertemperatur inkubieren (hypotoner Schock zur überlagerungsfreien Ausbreitung der Chromosomen in der Metaphase).
- (3) Zentrifugieren bei 200xg für 10 Minuten, Überstand verwerfen.
- (4) Sediment unter Durchpipettieren mit 4,0 ml eines frisch angesetzten, gekühlten Methanol-Eisessig-Gemisches (3:1) versetzen. 10 Minuten bei 200xg zentrifugieren, Überstand abheben.
- (5) Den Vorgang (4) zweimal wiederholen.
- (6) Auftropfen der Zellsuspension auf eisgekühlte, feuchte Objektträger. Präparate an der Luft trocknen.

2. CHO-Zellkulturen

2.1. Kultivierung von CHO-Zellen

Alle Experimente mit Zellkulturen des Chinesischen Hamsters (CHO) wurden in Leiden, Department of Radiation Genetics and Chemical Mutagenesis, durchgeführt. Die Stammkulturen wurden in 10 ml Petrischalen mit 8,5 ml Ham's F10 Medium, 1,5 ml fötalem Kälberserum, 1 mg Dihydrostreptomycin und 100 I.E. Penicillin kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank. Im Abstand von 48 Stunden wurde das Medium abgehoben und 1 ml auf 37 °C erwärmte Trypsin-EDTA-Lösung (0,05%/0,02%) zugegeben, was die Zellen vom Gefäßboden löst. Die Trypsinierung wurde nach 3 Minuten durch Zugabe von 2 ml Kulturmedium gestoppt, die Zellsuspension in Petrischalen mit frischem Medium überführt.

2.2. Ansatz der CHO-Kulturen

2.2.1. Versuchsansatz für G2-Behandlungen

Konfluente Zellen einer 10 cm Petrischale wurden abtrypsiniert und auf etwa 16 Petrischalen (6cm) verteilt. Vollmedium (s. 2.1.) wurde zugegeben und die Zellen für einen Zyklus (13-15 Stunden) bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Mutagenbehandlung.

2.2.2. Versuchsansatz für G1-Behandlungen

48 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Zellen einer Stammkultur in 180 ml Vierkantflaschen überführt. Zur Synchronisation der Zellpopulation wurden die mitotischen Zellen durch Abschütteln in das Kulturmedium überführt, anschließend wurde für 10 Minuten bei 200xg zentrifugiert. Das Sediment wurde in Eis aufbewahrt. Abschütteln und zentrifugieren wurden nach 30 Minuten wiederholt, das Zellsediment vereinigt und gut durchpipettiert. Anschließend wurden die Zellen in Petrischalen (6cm) mit frischem Kulturmedium überführt. Nach 90-120 Minuten wurden die Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus mit dem Mutagen behandelt.

2.3. Mutagenbehandlung

Die Mutagenbehandlung wurde in den Petrischalen mit Kulturmedium durchgeführt. Sowohl G1- als auch G2-Zellen wurden für 30 Minuten bei 37 °C mit dem Mutagen behandelt. Bei Behandlungsende wurde das Medium verworfen und die Kulturen einmal mit PBS (Phosphat Puffer Saline) gewaschen. Anschließend wurden NE und Virus zugegeben.

2.4. Bestrahlung

Die Bestrahlung erfolgte mit einer ENRAF Apparatur bei 150 kV und 6,5 mA. Die Dosisleistung lag bei 4 R/sec. Das Kulturmedium wurde aufgehoben, die Zellen in den Petrischalen bei Zimmertemperatur bestrahlt und in Eis überführt. Anschließend wurden NE und Virus zugegeben.

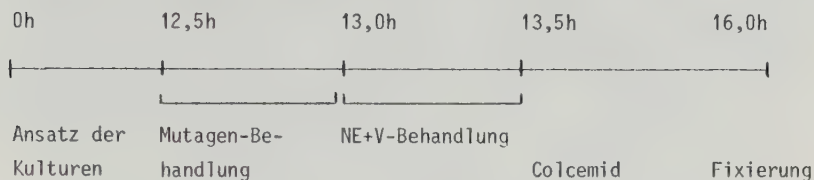
2.5. Enzym- und Virusbehandlung

NE+V wurden immer unmittelbar nach der Mutagenbehandlung oder Röntgenbestrahlung zugegeben. Das Lösen der Viren und die Enzymaktivität wurden unter 1.5. und 1.6. (Material und Methoden Lymphozytenkulturen) beschrieben. G2-Zellen wurden mit 12-24 Einheiten NE und 375 Einheiten Virus, gelöst in 0,3 ml Medium, nachbehandelt. G1-Zellen wurden mit 2-4, 6-12 oder 12-24 Einheiten pro Kultur und 375 Einheiten Virus, gelöst in 0,3 ml Medium, nachbehandelt. Die Behandlungsdauer betrug in beiden Versuchsansätzen 30 Minuten (15 Min. auf Eis, 15 Min. bei 37 °C). Anschließend wurde frisches, vorgewärmtes Kulturmedium, einschließlich 0,2 ml Colcemidlösung (Endkonzentration in den Kulturen 0,08 µg/ml), zugegeben. Nach 2-5 Stunden wurden die Zellen fixiert. In einigen Experimenten wurde gleichzeitig mit NE und Virus 50 µl BUdR zugegeben.

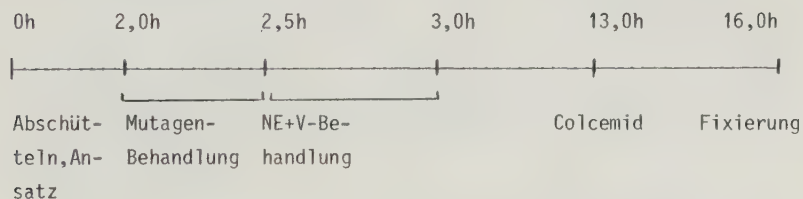
(Endkonzentration $10^{-5}M$). Diese Kulturen wurden zur Auswertung von SCE in zweiten Mitosen (30 Stunden nach BUDR-Zugabe) herangezogen.

2.6. Versuchsplan

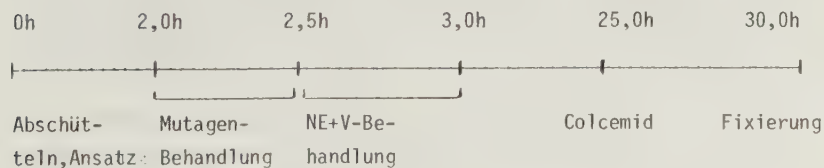
Behandlung von G2-Zellen, Auswertung auf strukturelle Aberrationen:



Behandlung von G1-Zellen, Auswertung auf strukturelle Aberrationen:



Behandlung von G1-Zellen, Auswertung zweiter Mitosen auf SCE:



2.7. Aufarbeiten

Am Ende der Kulturzeit wurden die Zellen nach folgendem Schema fixiert:

- (1) Medium abheben und Zellen für 5 Minuten mit 0,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung (0,05%/0,02%) behandeln.
- (2) Kräftig durchpipettieren und Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen überführen.
- (3) 10 Minuten bei 200xg zentrifugieren, Überstand abheben, Sediment mit 5,0 ml vorgewärmtem 1%-igem Na-Citrat versetzen und 10 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubieren.
- (4) 10 Minuten bei 200xg zentrifugieren, Überstand abheben und Sediment unter Durchpipettieren mit 4,0 ml eines frisch angesetzten Methanol-Eisessig-Gemisches (3:1) versetzen.
- (5) Erneut zentrifugieren, Überstand abheben, Methanol-Eisessig-Gemisch zugeben, zentrifugieren.
- (6) Überstand bis auf 0,5 ml abheben und Zellsuspension aus eiskühlte, feuchte Objektträger auftropfen. Präparate an der Luft trocknen.

3. Bei Lymphozyten und CHO-Zellen verwendete Methoden

3.1. Giemsa-Färbung

Die Präparate wurden für 8 Minuten in einer 5%-igen Giemsa-Lösung (Azur-Eosin-Methylenblau) mit 25% Phosphatpuffer (pH 6,88; 0,02 M) und 70% aqua dest. gefärbt, anschließend in aqua dest. gespült und luftgetrocknet.

3.2. Differentielle Schwesterchromatiden-Färbung

Den 3-Tage-Lymphozytenkulturen wurde zur 19. oder 20. Kulturstunde, einigen CHO-Zellkulturen direkt nach der Mutagenbehandlung, 50 µl einer 5-Bromdesoxyuridin (BUdR)-Lösung (Endkonzentration 10^{-5} M) zugegeben. Anschließend wurden die Kulturen im Dunkeln inkubiert um Photolyse der BUdR-substituierten DNA auszuschließen. Werden Lymphozyten und CHO-Zellen für zwei aufeinanderfolgende Synthesephasen in Gegenwart von BUdR kultiviert, lassen sich nach Behandlung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 in der zweiten Metaphase die Schwesterchromatiden unterscheiden und so SCE erkennen. Die Chromatide, deren DNA-Helix beidsträngig durch BUdR substituiert ist, kondensiert weniger

stark und färbt sich in der nachfolgenden Fluoreszenz-Giemsa-Färbung schwächer an als die einsträngig BUdR substituierte DNA-Helix der anderen Chromatide (KATO 1974; LATT 1974; PERRY und WOLFF 1974).

Die luftgetrockneten Präparate wurden nach der modifizierten Methode von WOLFF und PERRY(1974) differentiell gefärbt:

- (1) Altern der Präparate für mindestens 5 Tage bei Zimmertemperatur.
- (2) 15 Minuten färben in einer wässrigen Hoechst-Lösung (4,5 µg/ml).
- (3) Spülen in aqua dest., einbringen in feuchte Kammern, besprühen der Präparate mit PBS.
- (4) Für 30 Minuten mit UV-Licht von 260 nm Wellenlänge bestrahlen.
- (5) Mit aqua dest. spülen, in Küvetten mit 10xSSC (1,5 M NaCl+0,15 M Natrium-citrat-2-hydrat) einbringen und für 30 Minuten bei 62 °C im Wasserbad inkubieren.
- (6) Spülen mit aqua dest., Giemsa-Färbung.

3.3. Auswertung

Lymphozytenkulturen:

In 2-Tage-Kulturen wurden vollständige Metaphasen nach strukturellen Aberrationen ausgewertet. Die 3-Tage-Kulturen wurden nach SCE ausgewertet. Einige BUdR-markierte Präparate wurden zur Bestimmung der Mitosefolgen und des Mitose-Index herangezogen.

CHO-Zellkulturen:

Es wurden erste Mitosen nach Kulturansatz auf strukturelle Aberrationen und zweite Mitosen auf SCE ausgewertet. Es wurden nur Metaphasen mit 20-22 Chromosomen berücksichtigt.

Achromatische Läsionen wurden ausgewertet aber nicht mit in die Kalkulation der Anzahl aberranter Mitosen einbezogen.

Zur Auswertung wurde ein Leitz-Ölimmersionsmikroskop (Objektiv 100x, Okular 10x) benutzt.

4. Herkunft der Chemikalien

Acetaldehyd	Merck Darmstadt)
Diepoxybutan	
Formaldehyd	
Giemsa-Lösung	
KCl	
Koffein	
Methylmethansulfonat	
Neurospora Endonuclease	Boehringer (Mannheim)
Medium Ham's F10	Seromed (München)
Fötale Kälberserum	
Bleomycin	Mack (Illertissen)
Hoechst 33258	Riedel-De Haen (Hannover)
Penicillin	Hoechst (Frankfurt)
Phytohämagglutinin M	Difco (Detroit)
Polyäthylenglycoll	Roth (Karlsruhe)
Streptomycin	Heyl (Berlin)
Trenimon	Bayer (Leverkusen)
Methyl-Nitro-Nitroso-Guanidin	Ega-Chemie (Steinheim)
Benzidin	Sigma (St. Louis)
Diethystilbestrol	
Hydrazin-Sulfat	
4-Nitroquinolin-Oxid	
Sendai Viren	Department of Radiation Genetics and Chemical Mutagenesis, Leiden (Niederlande)

Im Ergebnisteil werden Behandlungsbedingungen, Kulturzeiten und Konzentrationen zu jedem Experiment noch einmal ausführlich angegeben.

ERGEBNISSE

Die folgende Zusammenstellung gibt einen Überblick über die bei Lymphozyten und CHO-Zellen erhobenen Daten:

1. Lymphcytenkulturen, Auswertung auf strukturelle Aberrationen

1.1. Entwickeln der Methode

- 1.1.1. G0-Behandlung mit NE und V (Tab.1)
- 1.1.2. G1-Behandlung mit NE und V (Tab.2,3,4,5)
- 1.1.3. G2-Behandlung mit NE und V (Tab.6,7,8,9)
- 1.1.4. NE-Behandlung zu verschiedenen Zeiten des Zellzyklus (Tab.10)

1.2. Behandlung mit PEG, KCL und Virus

- 1.2.1. G2-Behandlung mit PEG (Tab.11a,b)
- 1.2.2. G2-Röntgenbestrahlung PEG Nachbehandlung (Tab.12a,bc,d,e;Abb.1)
- 1.2.3. G0-Röntgenbestrahlung oder BLM-Behandlung, Nachbehandlung mit KCL, NE und V (Tab.13,14a,b)

1.3. Röntgenstrahlen

- 1.3.1. G0-Bestrahlung, Nachbehandlung mit NE und V (Tab.15,16)
- 1.3.2. G1-Bestrahlung, Nachbehandlung mit NE und V (Tab.17a,b,c;Abb.2)
- 1.3.3. G2-Bestrahlung, Nachbehandlung mit NE und V (Tab.18a,b,c,19;Abb.3)

1.4. Bleomycin (BLM)

- 1.4.1. G0-Behandlung mit BLM, NE und V (Tab.20,21,22a,b,c)
- 1.4.2. G1-Behandlung mit BLM, NE und V (Tab.23a,b,c,d)
- 1.4.3. G2-Behandlung mit BLM, NE und V (Tab.24,25a,b,26,27;Abb.4)

1.5. Methylmethansulfonat (MMS)

- 1.5.1. G1-Behandlung mit MMD, NE und V (Tab.28,29a,b,30,31,32)
- 1.5.2. G2-Behandlung mit BLM, NE und V (Tab.33,34,35)

1.6. Diepoxybutan (DEB)

- 1.6.1. G1-Behandlung mit DEB, NE und V (Tab.36,37,38,39,40;Abb.5)
- 1.6.2. G2-Behandlung mit DEB und NE (Tab.41)

1.7. Trenimon (Tre)

1.7.1. G1-Behandlung mit Trenimon und NE (Tab.42a,b,c,43;Abb.6)

1.7.2. G2-Behandlung mit Trenimon und NE (Tab.44,45,46)

1.8. Acetaldehyd

1.8.1. G1-Behandlung mit Acetaldehyd und NE (Tab.47)

1.9. Formaldehyd

1.9.1. G1-Behandlung mit Formaldehyd und NE (Tab.48)

2. Lymphozytenkulturen, Auswertung auf SCE

2.1. G1-Behandlung von Kontrollkulturen mit NE (Tab.49a,b)

2.2. G1-Behandlung mit DEB und NE (Tab.50,51)

2.3. G1-Behandlung mit Trenimon und NE (Tab.52)

2.4. Mitosefolgen (Tab.53a,b,54)

2.5. Mitoseindices (Tab.55,56,57)

3. CHO-Kulturen, Auswertung auf strukturelle Aberrationen

3.1. G2-Mutagenbehandlung, Nachbehandlung mit NE+V (im Testsystem positive Substanzen)

3.1.1. G2-Behandlung mit Bleomycin, NE+V (Tab.58;Abb.7)

3.1.2. G2-Behandlung mit Röntgenstrahlen, NE+V (Tab.59;Abb.8)

3.1.3. G2-Behandlung mit Dimethylsulfat, NE+V (Tab.60a,b)

3.1.4. G2-Behandlung mit Ethylmethansulfonat, NE+V (Tab.61)

3.1.5. G2-Behandlung mit Koffein, NE+V (Tab.62a,b)

3.1.6. G2-Behandlung mit Methylnitrosourea, NE+V (Tab.63)

3.1.7. G2-Behandlung mit Methyl-Nitro-Nitroso-Guanidin, NE+V (Tab.64a,b,c,d)

3.1.8. G2-Behandlung mit 4-Nitroquinolin-Oxid, NE+V (Tab.65)

3.2. G2-Mutagenbehandlung, Nachbehandlung mit NE+V (im Testsystem negative Substanzen)

3.2.1. G2-Behandlung mit Benzidin, NE+V (Tab.66)

3.2.2. G2-Behandlung mit Diepoxybutan, NE+V (Tab.67)

3.2.3. G2-Behandlung mit Diethylstilbestrol, NE+V (Tab.68)

3.2.4. G2-Behandlung mit Ethylnitrosourea, NE+V (Tab.69)

3.2.5. G2-Behandlung mit Hydrazin-Sulfat, NE+V (Tab.70)

3.2.6. G2-Behandlung mit Trenimon, NE+V (Tab.71)

3.3. G1-Mutagenbehandlung, Nachbehandlung mit NE+V

- 3.3.1. G1-Behandlung mit Diepoxybutan, NE+V (Tab.72,73;Abb.9)
- 3.3.2. G1-Behandlung mit Methylmethansulfonat, NE+V (Tab.74,75,76)
- 3.3.3. G1-Behandlung mit Trenimon, NE+V (Tab.77a,b,c)

4. CHO-Kulturen, Auswertung auf SCE

- 4.1. G1-Behandlung mit Diepoxybutan, NE+V (Tab.78)
- 4.2. G1-Behandlung mit Trenimon, NE+V (Tab.79)

1. Lymphozytenkulturen, Auswertung auf strukturelle Aberrationen

1.1. Entwickeln der Methode

Es wurde getestet, ob Behandlung mit NE und V einen Einfluß auf die Rate struktureller Aberrationen in menschlichen Lymphozyten hat. Hierzu wurde das Zellsediment mit verschiedenen Dosen NE und V in der G0-, G1- und G2-Phase des Zellzyklus behandelt. Die höchste, nicht toxische, NE- und V-Konzentration wurde anschließend bei verschiedenen Behandlungstemperaturen getestet. In weiteren Experimenten wurde die Wirkung von NE auf Lymphozyten in der S-Phase untersucht.

Behandlungsbedingungen, Kulturzeiten und Konzentrationen sind aus den Tabellenköpfen ersichtlich.

In allen Tabellen des Ergebnisteils ist die Bruchrate (Anzahl der Bruchereignisse pro 100 Mitosen) angegeben. Somit lassen sich Aberrationshäufigkeiten an Hand einer Zahl in mutagenbehandelten, sowie in Mutagen und NE behandelten Kulturen vergleichen. Die Bruchrate wurde wie folgt berechnet:

Achromatische Läsionen (A1)	=	nicht berücksichtigt
Chromatidbrüche (B')	=	1
Isochromatid-/Chromosomenbrüche (B'')	=	1
Chromatidentranslokationen (RB')	=	2
Dizentrische Chromosomen (Dic)	=	2
Ringchromosomen (Ring)	=	2

1.1.1. GO-Behandlung mit NE und V

Vollblut wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen NE (4-8, 6-12, 8-16 Einheiten) oder mit NE und V (125 I.E.) behandelt (Tab.1). Eine Steigerung der Aberrationsrate im Vergleich zu unbehandelten Kontrollkulturen konnte nicht gefunden werden. Die höchste getestete NE-Konzentration (8-16 Einheiten) wirkte cytotoxisch.

TABELLE 1:

EINFLUSS EINER GO-BEHANDLUNG MIT NE UND V AUF DIE RATE STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN

Behandlungsdauer NE+V 15 Minuten in Eis, 15 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 50 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruch- Dic+Ring rate
			A1	B'	B''	RB'		
K0	100	0,0	-	-	-	-	-	0,0
4-8E.NE	100	1,0	-	1,0	-	-	-	1,0
6-12E.NE	50	0,0	2,0	-	-	-	-	0,0
8-16E.NE	-	-	keine Mitosen					
4-8E.NE+125I.E.V	100	1,0	3,0	-	-	1,0	-	2,0
6-12E.NE+125I.E.V	93	0,0	-	-	-	-	-	0,0
8-16E.NE+125I.E.V	-	-	Keine Mitosen					

1.1.2. G1-Behandlung mit NE und V

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse einer NE-Behandlung zur 20. Kulturstunde. Die Anzahl aberranter Mitosen schwankt zwischen 1% und 4% nach der NE-Behandlung. 8-16 Einheiten NE schädigen die Lymphozyten so stark, daß bei einer Kulturdauer von 50 Stunden keine Mitosen gefunden werden.

TABELLE 2:

EINFLUSS EINER G1-BEHANDLUNG MIT NE AUF DIE RATE STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN

Behandlungsdauer NE 15 Minuten in Eis, 15 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 50 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruch- rate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
K0	200	0,0	3,5	-	-	-	-	0,0
2-4E.NE	200	4,0	0,5	3,0	1,0	-	-	4,0
4-8E.NE	200	3,0	6,0	2,0	1,0	-	-	3,0
6-12E.NE	100	1,0	2,0	-	-	-	1,0	2,0
8-16E.NE	-	-	Keine Mitosen					

In einem weiteren Experiment (Tab.3) wurde das Zellsediment zur 20. Kulturstunde mit 62,5 , 125 oder 250 I.E. Virus behandelt. Auch in diesem Versuch wurde keine Erhöhung der Aberrationsrate durch die Virusbehandlung gefunden.

TABELLE 3:

EINFLUSS EINER G1-BEHANDLUNG MIT VIRUS AUF DIE RATE STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN

Behandlungsdauer V 15 Minuten in Eis, 15 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 50 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruch- rate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
K0	200	0,0	3,5	-	-	-	-	0,0
62,5 I.E.V	200	1,0	-	1,0	-	-	-	1,0
125 I.E.V	200	2,0	2,0	1,5	0,5	-	-	2,0
250 I.E.V	200	0,0	1,5	-	-	-	-	0,0

Im Folgenden wurden Behandlungsdauer und Temperatur während der Inkubation mit NE und V variiert (Tab.4). Das Zellsediment wurde zur 20. Kulturstunde unter folgenden Bedingungen mit NE und V behandelt:
 (a) 15 Minuten in Eis, 15 Minuten bei 37°C, (b) 30 Minuten bei 37°C, (c) 60 Minuten bei 37°C, (d) 30 Minuten bei 39°C. Längere Behandlungszeiten führten zu Zellzyklusverzögerungen, weil die Zellen während der Behandlung ohne Kulturmedium inkubiert wurden. Höhere Temperaturen als 39°C schädigten die Lymphozyten so stark, daß keine Mitosen gefunden wurden. Somit kann das Temperaturoptimum der NE-Wirkung (45°C) in Lymphozytenkulturen nicht erreicht werden.

TABELLE 4:

EINFLUSS EINER G1-BEHANDLUNG MIT NE UND VIRUS AUF DIE RATE STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN.

Konzentration NE: 4-8 Einheiten; Konzentration V 125 I.E.

Kulturdauer 50 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung.

Behandlung	Behandlungs- dauer NE+V	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen				
				A1	B'	B''	RB'	Bruchrate
K0		200	0,0	3,5	-	-	-	0,0
K0+V	15 Min.Eis.	200	2,0	2,0	1,5	0,5	-	2,0
K0+NE	15 Min.37° C	200	3,0	6,0	2,0	1,0	-	3,0
K0+NE+V		200	5,0	2,0	5,0	-	-	5,0
K0		200	1,0	3,0	0,5	-	0,5	1,5
K0+V	30 Min.bei	200	0,0	1,0	-	-	-	0,0
K0+NE	37° C	200	1,5	3,0	1,5	-	-	1,5
K0+NE+V		200	1,0	5,0	1,0	-	-	1,0
K0		200	0,0	0,5	-	-	-	0,0
K0+V	60 Min.bei	200	1,5	1,0	1,0	-	0,5	2,0
K0+NE	37° C	200	3,0	2,5	3,0	-	-	3,0
K0+NE+V		200	0,0	6,0	-	-	-	0,0
K0		200	2,0	3,5	2,0	-	-	2,0
K0+V	30 Min.bei	200	1,0	0,5	0,5	0,5	-	1,0
K0+NE	39° C	200	2,5	1,0	2,5	-	-	2,5
K0+NE+V		200	1,0	-	1,0	-	-	1,0

Temperatur und Behandlungsdauer beeinflussen die Aberrationsrate nicht, deshalb wurden die vergleichbaren Daten, ohne die Behandlungsbedingungen zu berücksichtigen, in Tabelle 5 zusammengefaßt. Bei 800 ausgewerteten Mitosen lag die Bruchrate in unbehandelten Kulturen bei 0,88, nach einer Virusbehandlung bei 1,25, nach NE-Behandlung bei 2,50 und nach einer kombinierten Behandlung mit NE+V bei 1,75.

TABELLE 5:

EINFLUSS EINER G1 -BEHANDLUNG MIT NE UND VIRUS AUF DIE RATE STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN

Konzentration NE: 4-8 Einheiten, V 125 I.E.

Kulturdauer 50 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen				Bruch- rate
			A1	B'	B''	RB'	
KD	800	0,8	2,6	0,6	-	0,1	0,9
KD+V	800	1,1	1,1	0,8	0,3	-0,1	1,3
KD+NE	800	2,5	3,0	2,3	0,3	-	2,5
KD+NE+V	800	1,8	3,3	1,8	-	-	1,8

1.1.3. G2-Behandlung mit NE und V

Das Zellsediment wurde zur 45. Kulturstunde mit verschiedenen Konzentrationen NE (2-4, 4-8, 6-12 oder 8-16 Einheiten) behandelt (Tab.6). Die Anzahl aberranter Mitosen lag in behandelten Kulturen zwischen 0% und 2%. Nach Zugabe von 6-12 und 8-16 Einheiten NE konnten jeweils nur noch 50 Mitosen ausgewertet werden.

TABELLE 6:

EINFLUSS EINER G2-BEHANDLUNG MIT NE AUF DIE RATE STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN

Behandlungsdauer NE 15 Minuten in Eis, 15 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 50 h einschließlich 4 h Colcemidbehandlung

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruch- rate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
K0	200	1,0	4,5	1,0	-	-	-	1,0
2-4E.NE	200	0,0	3,0	-	-	-	-	0,0
4-8E.NE	200	2,0	2,0	1,5	0,5	-	-	2,0
6-12E.NE	50	0,0	-	-	-	-	-	0,0
8-16E.NE	50	2,0	2,0	2,0	-	-	-	2,0

Das Zellsediment wurde zur 45. Kulturstunde mit 62,5 , 125 oder 250 I.E. Virus behandelt (Tab.7). Auch in diesem Experiment lag die Aberrationsrate nicht über 2%.

TABELLE 7:

EINFLUSS EINER G2-BEHANDLUNG MIT VIRUS AUF DIE RATE STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN

Behandlungsdauer V 15 Minuten in Eis, 15 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 50 h einschließlich 4 h Colcemidbehandlung

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruch- rate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
K0	200	1,0	4,5	1,0	-	-	-	1,0
62,5I.E.V	200	0,0	1,0	-	-	-	-	0,0
125I.E.V	200	1,0	8,5	1,0	-	-	-	1,0
250I.E.	200	2,0	6,0	2,0	-	-	-	2,0

Im Folgenden wurden Behandlungsdauer und Temperatur während der Inkubation mit NE und V variiert (Tab.8). Das Zellsediment wurde zur 45.Kulturstunde unter folgenden Bedingungen mit NE und V behandelt: (a) 15 Minuten in Eis, 15 Minuten bei 37 °C, (b) 30 Minuten bei 37 °C, (c) 60 Minuten bei 37 °C, (d) 30 Minuten bei 39 °C. Auch in der G2-Phase des Zellzyklus haben Temperatur und Behandlungsdauer keinen Einfluß auf die Aberrationsrate.

TABELLE 8:

EINFLUSS EINER G2-BEHANDLUNG MIT NE UND VIRUS AUF DIE RATE STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN

Konzentration NE 4-8 Einheiten, Konzentration Virus 125 I.E.

Kulturdauer 50 h einschließlich 4 h Colcemidbehandlung.

Behandlung	Behandlungs- dauer NE+V	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruch- rate
				A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
K0		200	1,0	4,5	1,0	-	-	-	1,0
K0+V	15 Min.Eis,	200	1,0	8,5	1,0	-	-	-	1,0
K0+NE	15 Min. 37° C	200	2,0	2,0	1,5	0,5	-	-	2,5
K0+NE+V		200	2,5	3,0	2,0	0,5	-	-	2,5
K0		200	2,0	4,5	2,0	-	-	-	2,0
K0+V	30 Min.bei	200	2,0	4,5	2,0	-	-	-	2,0
K0+NE	37° C	200	0,5	3,0	0,5	-	-	-	2,0
K0+NE+V		200	2,0	9,0	2,0	-	-	-	2,0
K0		200	0,0	-	-	-	-	-	0,0
K0+V	60 Min.bei	200	1,0	2,5	1,0	-	-	-	1,0
K0+NE	37° C	200	1,5	1,0	1,5	-	-	-	1,5
K0+NE+V		200	2,0	2,0	2,0	-	-	-	2,0
K0		200	0,5	2,0	0,5	-	-	-	0,5
K0+V	30 Min.bei	200	0,0	-	-	-	-	-	0,0
K0+NE	39° C	200	1,0	5,0	0,5	0,5	-	-	1,0
K0+NE+V		200	1,5	6,5	1,0	0,5	-	-	1,5

Temperatur und Behandlungsbedingungen beeinflussen die Aberrationsraten nicht, deshalb wurden die vergleichbaren Daten, ohne die Behandlungsbedingungen zu berücksichtigen, in Tabelle 9 zusammengefaßt. Bei 800 ausgewerteten Mitosen lag die Bruchrate in unbehandelten Kulturen bei 0,88 , nach einer Virusbehandlung bei 1,13 , nach NE-Behandlung bei 1,25 und nach einer kombinierten NE+V-Behandlung bei 2,00.

TABELLE 9:

EINFLUSS EINER G2-BEHANDLUNG MIT NE UND VIRUS AUF DIE RATE STRUKTURELLER ABERRATIONEN
IN LEUKOZYTENKULTUREN
Konzentration NE 4-8 Einheiten, Konzentration V 125 I.E.
Kulturdauer 50 h einschließlich 4 h Colcemidbehandlung

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen				Bruch- rate
			A1	B'	B''	RB'	
K0	800	0,9	2,8	0,9	-	-	0,9
K0+V	800	1,1	4,6	1,0	0,1	-	1,1
K0+NE	800	1,3	2,8	1,0	0,3	-	1,3
K0+NE+V	800	2,0	5,1	1,8	0,3	-	2,1

1.1.4. NE-Behandlung zu verschiedenen Zeiten des Zellzyklus

Es sollte untersucht werden, ob NE-Behandlung in Abhängigkeit vom Zellzyklus Aberrationen induziert. Für jede Behandlungszeit wurde eine Kontrollkultur und eine NE-behandelte Kultur angelegt. Von der 16. bis zur 45. Kulturstunde wurde im Abstand von 2 Stunden eine 30 minütige Behandlung des Zellsediments mit NE durchgeführt. Aus versuchstechnischen Gründen wurden vier voneinander unabhängige Experimente angesetzt und die Ergebnisse in Tabelle 10 zusammengefaßt.

Die höchsten Aberrationsraten wurden nach einer NE-Behandlung zur 18. Kulturstunde (5% aberrante Mitosen), 34. Kulturstunde (6,3% aberrante Mitosen), 37. Kulturstunde (8% aberrante Mitosen) und 39. Kulturstunde (6% aberrante Mitosen) induziert. Diese Werte sind deutlich gegenüber allen Kontrollkulturen erhöht. Insgesamt wurden 2700 Metaphasen aus Kontrollkulturen analysiert, darunter waren 17 (0,63%) aberrant. Die einzelnen Aberrationstypen wurden in folgenden Häufigkeiten gefunden: 14 B' (0,52%), 5 B'' (0,19%) und 1 RB' (0,04%).

Aus NE-behandelten Kulturen wurden insgesamt 2893 Metaphasen analysiert, darunter befanden sich 77 (2,66%) aberrante Mitosen. Die einzelnen Aberrationstypen wurden in folgenden Häufigkeiten gefunden: 66 B' (2,28%), 10 B'' (0,35%), 2 RB' (0,07%) und 1 Dic (0,03%).

Achromatische Läsionen wurden mitausgewertet, aber nicht in die Prozentzahl aberranter Mitosen einbezogen.. In Kontrollkulturen wurden 97 A1 (3,59%), in NE-behandelten Kulturen 177 A1 (6,08%) gefunden.

EINFLUSS EINER BEHANDLUNG MIT NE ZU VERSCHIEDENEN ZEITEN DES ZELLZYKLUS AUF DIE RATE STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN

Behandlungsdauer NE 30 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 50 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung

Behandlung	NE Zu- gabe (Std.nach Ansatz)	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruch- rate
				A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
K0	16	100	2,0	9,0	1,0	1,0	-	-	2,0
4-8Einh.NE		89	3,4	4,5	1,1	9,4	-	-	4,5
K0	18	100	2,0	4,0	2,0	2,0	-	-	4,0
4-8Einh.NE		100	5,0	5,0	5,0	1,0	-	-	6,0
K0	20	500	0,6	3,2	0,4	-	0,2	-	0,8
4-8Einh.NE		467	1,9	3,0	1,7	-	0,2	-	2,1
K0	22	200	0,0	3,0	-	-	-	-	0,0
4-8Einh.NE		108	3,7	5,6	3,7	-	-	-	3,7
K0	24	200	0,0	5,0	-	-	-	-	0,0
4-8Einh.NE		200	0,0	11,0	-	-	-	-	0,0
K0	26	200	0,0	4,0	-	-	-	-	0,0
4-8Einh.NE		200	0,0	5,0	-	-	-	-	0,0
K0	27	100	1,0	3,0	1,0	-	-	-	1,0
4-8Einh.NE		100	3,0	6,0	3,0	-	-	-	3,0
K0	28	200	0,5	6,0	0,5	-	-	-	0,5
4-8Einh.NE		200	0,5	6,0	-	0,5	-	-	0,5
K0	30	300	0,3	6,7	-	0,3	-	-	0,3
4-8Einh.NE		250	0,4	4,0	0,4	-	-	-	0,4
K0	34	200	1,0	1,0	0,5	0,5	-	-	1,0
4-8Einh.NE		300	6,3	11,7	4,3	1,7	0,3	-	6,6
K0	36	200	0,5	0,5	0,5	-	-	-	0,5
4-8Einh.NE		279	4,3	10,4	4,0	-	-	0,4	4,8
K0	37	100	0,0	-	-	-	-	-	0,0
4-8Einh.NE		100	8,0	6,0	8,0	-	-	-	8,0
K0	39	100	1,0	-	1,0	-	-	-	1,0
4-8Einh.NE		100	6,0	2,0	6,0	-	-	-	6,0
K0	41	100	0,0	-	-	-	-	-	0,0
4-8Einh.NE		100	3,0	5,0	3,0	-	-	-	3,0
K0	43	100	0,0	3,0	-	-	-	-	0,0
4-8Einh.NE		100	2,0	4,0	2,0	-	-	-	2,0
K0	45	200	2,0	4,5	2,0	-	-	-	2,0
4-8Einh.NE		200	0,5	3,0	0,5	-	-	-	0,5

1.2. Behandlung mit PEG, KCl und V

1.2.1. G2-Behandlung mit PEG

Die Behandlung mit PEG erfolgte zur Verbesserung der Permeabilität der Lymphozyten für die relativ großen NE-Moleküle. Voraussetzung für eine Verwendung von PEG als permeabilisierendes Agens ist, daß es allein keine strukturellen Aberrationen induziert.

Das Zellsediment wurde zur 45. Kulturstunde für 30 Minuten mit PEG inkubiert. In zwei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen (Tab.11a,b) wurden die Lymphozyten mit folgenden PEG-Konzentrationen behandelt: $4,0 \times 10^{-3} M$, $8,0 \times 10^{-3} M$ und $1,2 \times 10^{-2} M$. Im Vergleich zu unbehandelten Kulturen konnte keine erhöhte Aberrationsrate gefunden werden.

TABELLE 11 a:

Einfluss einer G2-Behandlung mit PEG auf die Rate struktureller Aberrationen in Leukozytenkulturen

Die Zellen wurden zur 45. Kulturstunde mit PEG behandelt.

Behandlungsdauer PEG 15 Minuten in Eis, 15 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 48 h einschließlich 3 h Colcemidbehandlung

Konzentration PEG	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen				Bruch- rate
			A1	B'	B''	RB'	
K0	100	1,0	4,0	1,0	-	-	1,0
$4 \times 10^{-3} M$	100	0,0	7,0	-	-	-	0,0
$8 \times 10^{-3} M$	100	0,0	6,0	-	-	-	0,0
$1,2 \times 10^{-2} M$	100	0,0	10,0	-	-	-	0,0

TABELLE 11 b:

Konzentration PEG	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen				Bruch- rate
			A1	B'	B''	RB'	
K0	100	0,0	1,0	-	-	-	0,0
4×10^{-3}	100	0,0	1,0	-	-	-	0,0
8×10^{-3}	100	1,0	4,0	1,0	-	-	1,0
$1,2 \times 10^{-2}$	100	1,0	4,0	1,0	-	-	1,0

1.2.2. G2-Röntgenbestrahlung und PEG-Nachbehandlung

Die Kulturen wurden zur 45. Kulturstunde bestrahlt, anschließend wurde das Zellsediment mit verschiedenen Dosen von PEG behandelt. Bei einer Bestrahlungsdosis von 50 R (Tab. 12a) beeinflusste die PEG-Nachbehandlung die Aberrationsrate nicht. Mit einer Bestrahlungsdosis von 100 R (Tab. 12b,c) wurden zwei Experimente durchgeführt. In einem Experiment erhöhte PEG die strahleninduzierte Aberrationsrate nicht. Im Wiederholungsversuch lag die Bruchrate in der bestrahlten Kultur bei 80, in der bestrahlten und mit $4,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ PEG behandelten Kultur bei 121. Bestrahlung mit 200 R (Tab. 12d,e) induzierte 140 B' und 18 RB' in 100 Mitosen. Bestrahlung und PEG-Behandlung hatte 270 B' und 28 RB' zur Folge, was mehr als einer Verdopplung der Bruchrate durch PEG entspricht.

TABELLE 12 a:

EINFLUSS EINER G2-NACHBEHANDLUNG MIT PEG AUF RÖNTGENSTRAHLEN INDUZIERT E STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN.

Die Zellen wurden zur 45. Kulturstunde bestrahlt. Anschließend wurde PEG auf das Zellsediment gegeben.

Behandlungsdauer PEG 15 Minuten in Eis, 15 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 48 h einschließlich 3 h Colcemidbehandlung

Bestrahlungsdosis 50 Röntgen

Konzentration PEG	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			Al	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
-	100	21,0	130,0	42,0	2,0	2,0	-	48,0
$4,0 \times 10^{-3} \text{ M}$	100	18,0	151,0	32,0	2,0	2,0	-	38,0
$8,0 \times 10^{-3} \text{ M}$	68	26,5	224,0	50,0	2,9	2,9	-	58,7
$1,2 \times 10^{-2} \text{ M}$	67	19,4	225,0	50,0	1,5	2,9	-	57,3

TABELLE 12 b:

Bestrahlungsdosis 100 Röntgen

Konzentration PEG	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen				Bruch- rate
			Al	B'	B''	RB'	
-	100	34,0	64,0	62,0	3,0	4,0	73,0
$4 \times 10^{-3} \text{ M}$	100	39,0	82,0	65,0	1,0	11,0	88,0
$8 \times 10^{-3} \text{ M}$	100	34,0	72,0	60,0	1,0	6,0	73,0
$1,2 \times 10^{-2} \text{ M}$	100	44,0	73,0	70,0	4,0	5,0	84,0

TABELLE 12 c:

Bestrahlungsdosis 100 Röntgen

Konzentration PEG	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in			100 Mitosen RB'	Dic+Ring	Bruchrate
			A1	B'	B''			
-	100	35,0	362,0	64,0	4,0	6,0	-	80,0
$4,0 \times 10^{-3} M$	100	51,0	588,0	102,0	3,0	8,0	-	121,0
$8,0 \times 10^{-3} M$	100	30,0	333,0	54,0	1,0	3,0	-	61,0
$1,2 \times 10^{-2} M$	100	44,0	377,0	67,0	4,0	17,0	-	105,0

TABELLE 12 d:

Bestrahlungsdosis 200 Röntgen

Konzentration PEG'	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in			100 Mitosen RB'	Dic+Ring	Bruchrate
			A1	B'	B''			
-	68	48,5	189,7	75,0	2,9	13,2	-	104,2
$4,0 \times 10^{-3} M$	35	47,3	183,3	72,0	11,1	11,1	-	105,3
$8,0 \times 10^{-3} M$	68	60,3	223,5	100,0	4,4	13,2	-	130,8
$1,2 \times 10^{-2} M$	44	72,7	227,3	111,0	6,8	27,3	-	172,4

TABELLE 12 e:

Bestrahlungsdosis 200 Röntgen

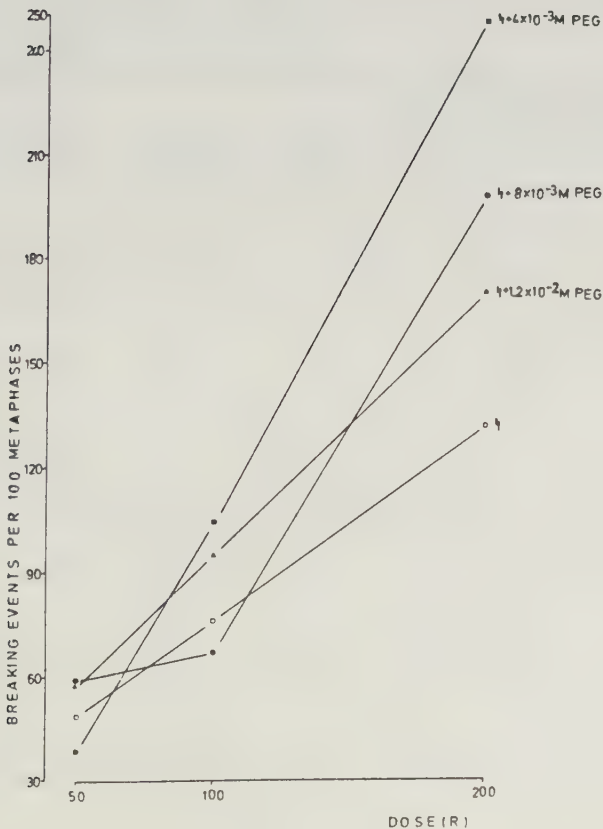
Konzentration PEG	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in			100 Mitosen RB'	Bruch- rate
			A1	B'	B''		
-	87	57,5	512,0	140,0	5,7	8,1	163,1
$4 \times 10^{-3} M$	88	71,6	664,0	270,0	9,1	28,0	335,1
$8 \times 10^{-3} M$	37	67,6	840,0	197,0	8,1	29,7	264,5
$1,2 \times 10^{-2} M$	-	-				nicht auswertbar	

ABBILDUNG 1

Bruchrate in menschlichen Lymphozyten nach Röntgenbestrahlung und PEG-Nachbehandlung in der G2-Phase des Zellzyklus.

Die Abbildung zeigt die zusammengefaßten Daten aus Tabelle 12a-e.

- : Bruchrate aus Kulturen, die nur bestrahlt wurden
- : Bruchrate aus Kulturen, die bestrahlt und mit $4 \times 10^{-3} \text{M}$ PEG nachbehandelt wurden
- : Bruchrate aus Kulturen, die bestrahlt und mit $8 \times 10^{-3} \text{M}$ PEG nachbehandelt wurden
- ▲ : Bruchrate aus Kulturen, die bestrahlt und mit $1,2 \times 10^{-2} \text{M}$ PEG nachbehandelt wurden



1.2.3. GO-Röntgenbestrahlung oder BLM-Behandlung, Nachbehandlung
mit KCl, NE und V

In unstimulierten GO-Lymphozyten ist das Chromatin stärker kondensiert als in stimulierten Zellen. Deshalb können große Enzymmoleküle nur schwer an der DNA wirken. Durch eine hypotone KCl-Behandlung sollten die Lymphozyten aufgelockert und somit für NE zugänglicher gemacht werden. Vollblut wurde bestrahlt und anschließend für 15 Minuten mit KCl behandelt. Danach wurde das Zellsediment für 30 Minuten mit NE behandelt. Die KCl- und NE-Behandlung hatte nur einen geringen Einfluß auf die strahleninduzierte Aberrationsrate (Tab. 13a). Die Bestrahlungsdosis konnte nicht exakt bestimmt werden, an Hand der Austauschaberrationen läßt sich aber abschätzen, daß die Zellen mit ca. 200 R bestrahlt wurden.

TABELLE 13

EINFLUSS EINER GO-NACHBEHANDLUNG MIT NE AUF RÖNTGENSTRAHLEN INDUZIERTER STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN.
Das Vollblut wurde nach der Bestrahlung gekühlt und mit 4,0 ml 0,075 M KCl versetzt. Nach 15 Minuten Inkubation bei 37° C wurde das KCl ausgewaschen und Enzym zugegeben. Behandlungsdauer NE 15 Minuten in Eis, 15 Minuten bei 37° C
Kulturdauer 50 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung

Behandlung	KCL	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruch- rate
				AI	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
RO	-	100	33,0	4,0	-	14,0	-	20,0	60,0
RO	+	100	36,0	4,0	1,0	18,0	-	22,0	62,0
RO+2-4E.NE	+	100	34,0	8,0	-	12,0	-	25,0	62,0
RO+4-8E.NE	+	100	35,0	2,0	1,0	17,0	-	27,0	71,0
KO	+	100	2,0	3,0	2,0	-	-	-	2,0

Vollblut wurde in zwei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen für 30 Minuten mit BLM behandelt (Tab.14a,b). Die KCl-Zugabe erfolgte direkt nach der BLM-Pulsbehandlung. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurde das Zellsediment mit NE und V behandelt. Die Aberrationsraten blieben in beiden Versuchen durch die Nachbehandlung unbeeinflusst.

In allen durchgeführten Experimenten konnte somit bei unstimulierten GO-Lymphozyten keine oder nur eine geringe Steigerung der Aberrationsraten durch die KCl-Behandlung gefunden werden.

TABELLE 14 a:

EINFLUSS EINER GO-BEHANDLUNG MIT BLM, KCL, NE UND VIRUS AUF DIE RATE STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN.

Das Vollblut wurde für 30 Minuten bei 37° C mit BLM (50 µg/ml) behandelt (Pulsbehandlung).

Es folgte eine 15 minütige Behandlung mit 0,075 M KCL. Anschließend wurden NE (4-8 Einh.) und Virus (125 I.E.) zugegeben.

Behandlungsdauer NE+V 30 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 50 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung

Behandlung	KCL	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruch- rate
				Al	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
BLM	-	100	29,0	-	10,0	14,0	-	16,0	56,0
BLM	+	100	29,0	-	15,0	10,0	-	18,0	61,0
BLM+NE	+	100	28,0	-	12,0	9,0	-	17,0	55,0
BLM+NE+V	+	38	23,7	-	2,6	13,5	-	18,4	52,9
KO	+	100	1,0	-	-	1,0	-	-	1,0

TABELLE 14 b:

Behandlung	KCL	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruch- rate
				Al	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
BLM	-	100	27,0	5,0	12,0	9,0	2,0	22,0	69,0
BLM	+	100	33,0	3,0	12,0	10,0	1,0	40,0	104,0
BLM+NE	+	77	23,4	1,3	3,9	13,0	-	27,3	71,5
BLM+NE+V	+	100	26,0	4,0	12,0	14,0	1,0	21,0	70,0
KO	+	100	0,0	2,0	-	-	-	-	0,0

1.3. Röntgenstrahlen

1.3.1. GO-Bestrahlung, Nachbehandlung mit NE und V

Vollblut wurde bestrahlt, gekühlt (Eiswürfel) und mit NE behandelt. Bei den GO-Bestrahlungen ist wegen eines defekten Dosimeters in den Tabellen keine Bestrahlungsdosis angegeben. Das Blut wurde nach der Bestrahlung gemischt, sodaß behandelte und unbehandelte Kulturen eines Experimentes immer dieselbe Strahlendosis erhielten. An Hand der Austauschaberrationen kann die Dosis im ersten Experiment (Tab.15) auf ca. 50 R geschätzt werden. Es wurde die NE-Wirkung bei verschiedenen Behandlungsbedingungen getestet. Die Bruchrate lag nach der Bestrahlung bei 20,5. Nachbehandlung mit NE (30 Minuten bei 37°C) führte zu einer Bruchrate von 33,0. Eine 60 minütige Nachbehandlung mit NE bei 37°C hatte eine Bruchrate von 34,0 zur Folge.

TABELLE 15:

EINFLUSS EINER GO-NACHBEHANDLUNG MIT NE AUF RÖNTGENSTRAHLEN INDUZIERTER STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN.

Das Vollblut wurde nach der Bestrahlung gekühlt und mit 4-8 Einheiten NE behandelt. Kulturdauer 50 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung.

Behandlung	Behand- lungsdauer NE	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in			100 Mitosen		Bruch- rate
				Al	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
Röntgen	-	200	14,0	2,5	1,5	8,0	-	5,5	20,5
Röntgen+NE	15 Min.in Eis, 15 Min.bei 37°C	100	14,0	6,0	-	5,0	-	9,0	23,0
Röntgen+NE	20 Min.in Eis	100	15,0	4,0	1,0	4,0	-	13,0	31,0
Röntgen+NE	30 Min.in Eis	100	16,0	6,0	2,0	8,0	-	7,0	24,0
Röntgen+NE	30 Min.bei 37°C	100	22,0	2,0	1,0	10,0	-	11,0	33,0
Röntgen+NE	60 Min.bei 37°C	100	18,0	3,0	-	9,0	-	10,0	29,0
Röntgen+NE	30 Min.in Eis, 30 Min.bei 37°C	100	26,0	11,0	2,0	16,0	-	8,0	34,0
Röntgen+NE	60 Min.in Eis, 60 Min.bei 37°C	80	21,3	12,5	-	5,0	1,3	15,0	37,6

In einem weiteren Experiment wurden die Zellen mit ca. 50 R bestrahlt, die Bruchrate lag bei 20,5 (Tab.16). Nachbehandlung mit NE hatte eine Bruchrate von 23,0 (2-4 Einheiten), 23,5 (4-8 Einheiten) und 29,6 (4-8 Einheiten +125 I.E. Virus) zur Folge.

TABELLE 16:

EINFLUSS EINER G₀-NACHBEHANDLUNG MIT NE AUF RÖNTGENSTRAHLEN INDUZIERTER STRUKTURELLE ABERRATIONEN IM LEUKOZYTENKULTUREN.

Das Vollblut wurde nach der Bestrahlung gekühlt und mit NE und Virus (125 I.E.) behandelt.

Behandlungsdauer NE+V 15 Minuten in Eis, 15 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 50 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung.

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
Röntgen	200	14,0	2,5	1,5	8,0	-	5,5	20,5
Röntgen+2-4E.NE	100	14,0	6,0	-	5,0	-	9,0	23,0
Röntgen+4+8E.NE	72	20,0	6,9	1,4	8,3	-	6,9	23,5
Röntgen+4+8E.NE+V	186	19,4	4,3	0,5	9,7	-	9,7	29,6

Die weiteren Experimente wurden mit einer Röntgenröhre durchgeführt, deren Dosimeter exakt funktionierte (siehe G₁-und G₂-Bestrahlungen). Es wurden acht voneinander unabhängige Versuche mit folgenden Bestrahlungsdosen durchgeführt: 50 R, 100 R, 200 R und 300 R. Die NE-Nachbehandlung erfolgte mit 2-4 und 4-8 Einheiten für 30 Minuten bei 37° C. In drei Versuchen wurde zusätzlich für jede Dosis eine kombinierte NE+V-Behandlung durchgeführt. Alle acht Versuche erbrachten vergleichbare Ergebnisse: In Kulturen, die nur bestrahlt waren, wurden auswertbare Mitosen gefunden. In Kulturen, die mit NE oder NE+V behandelt waren, wurden keine stimulierten Zellen und keine Mitosen gefunden. Deshalb konnten weitere G₀-Ergebnisse nicht in Tabellen dargestellt werden.

1.3.2. G1-Bestrahlung, Nachbehandlung mit NE und V

In zwei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen (Tab. 17a,b) wurden die Zellen zur 20. Kulturstunde mit 50, 100, 150 oder 200 R bestrahlt und sofort mit NE und V nachbehandelt. In beiden Experimenten wurden nach der NE-Behandlung deutlich mehr Chromosomenaberrationen gefunden als in den entsprechenden Vergleichskulturen. Die kombinierte NE+V-Behandlung (Tab. 17a) steigert auch die Aberrationsrate im Vergleich zu der nur bestrahlten Kultur, dieser Anstieg ist aber geringer als bei einer Nachbehandlung mit NE.

TABELLE 17 a:

EINFLUSS EINER G1-NACHBEHANDLUNG MIT NE UND VIRUS AUF DIE RATE KONTGENSTRAHLEN INDUZIERTER STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN.

Die Zellen wurden zur 20. Kulturstunde bestrahlt. Anschließend wurden NE (4-8 Einheiten) und Virus (125 I.E.) zugegeben.

Behandlungsdauer NE+V 30 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 50 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruch- rate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
50 R	100	2	4	-	2	-	-	2
50 R+NE	100	8	3	4	2	-	2	10
50 R+NE+V	100	5	6	2	1	-	2	7
100 R	100	14	2	1	9	-	4	18
100 R+NE	100	24	9	2	18	-	9	38
100 R+NE+V	100	14	7	-	7	-	8	23
150 R	100	12	2	-	7	-	8	23
150 R+NE	100	24	6	4	18	-	8	38
150 R+NE+V	100	17	13	3	7	-	12	34
200 R	100	30	4	4	9	1	18	51
200 R+NE	100	39	4	4	19	-	22	67
200 R+NE+V	100	37	5	3	17	-	18	61

TABELLE 17 b:

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruch- rate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
50 R	100	7	1	3	2	1	1	9
50 R+NE	100	12	4	3	7	-	2	14
100 R	100	10	3	1	4	-	5	15
100 R+NE	100	18	9	4	6	1	7	26
150 R	100	9	5	2	3	-	4	13
150 R+NE	100	21	8	3	9	-	12	36
200 R	100	25	1	1	10	1	15	43
200 R+NE	100	47	8	3	26	-	23	75

Tabelle 17c zeigt die zusammengefaßten Ergebnisse beider Versuche. Die Rate der Chromosomenbrüche, Dizentrischen- und Ringchromosomen wurde durch die NE-Behandlung bei allen vier Bestrahlungsdosen verdoppelt. Chromatidtranslokationen und -brüche treten auch nach der NE-Behandlung nur vereinzelt auf.

TABELLE 17 c:

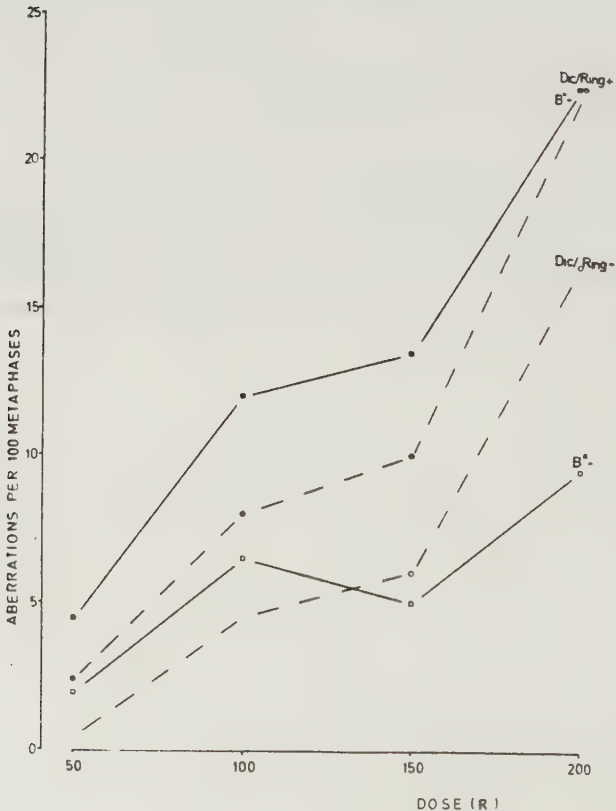
Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruch- rate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
50 R	200	4,5	2,5	1,5	2,0	-	0,5	4,5
50 R+NE	200	10,0	3,5	4,5	-	2,0	12,0	12,0
100 R	200	12,0	2,5	1,0	6,5	-	4,5	16,5
100 R+NE	200	21,0	9,0	3,0	12,0	0,5	8,0	32,0
150 R	200	10,5	3,5	1,0	5,0	-	6,0	18,0
150 R+NE	200	22,5	7,0	3,5	13,5	-	10,0	37,0
200 R	200	27,5	2,5	2,5	9,5	1,0	16,5	47,0
200 R+NE	200	43,0	6,0	3,5	22,5	-	22,5	71,0

ABBILDUNG 2:

Chromosomenaberrationen in menschlichen Lymphozyten nach Röntgenbestrahlung und NE-Nachbehandlung in der G1-Phase des Zellzyklus.

Die Abbildung zeigt die Daten aus Tabelle 17c.

- B''- : Isochromatid-/Chromosomenbrüche in bestrahlten Kulturen
B''+ : Isochromatid-/Chromosomenbrüche in bestrahlten und NE-nachbehandelten Kulturen
Dic/Ring - : Dizentrische-und Ringchromosomen in bestrahlten Kulturen
Dic/Ring+ : Dizentrische-und Ringchromosomen in bestrahlten und NE nachbehandelten Kulturen



1.3.3. G2-Bestrahlung, Nachbehandlung mit NE und V

In zwei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten wurden die Kulturen zur 46. Kulturstunde mit 30, 60, 90 oder 120 R bestrahlt (Tab.18a,b). Anschließend wurde das Zellsediment mit NE und V behandelt. In beiden Versuchen konnte eine deutliche Steigerung der Aberrationsraten durch die Nachbehandlung mit NE erreicht werden. Nach kombinierter NE+V-Behandlung (Tab.18a) wurde keine Steigerung der Aberrationsrate im Vergleich zu den nur bestrahlten Kulturen gefunden.

TABELLE 18 a:

EINFLUSS EINER G2-NACHBEHANDLUNG MIT NE UND VIRUS AUF DIE RATE RONTGENSTRAHLEN INDUZIERTER STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN.

Die Zellen wurden zur 46. Kulturstunde bestrahlt. Anschließend wurden NE (4-8 Einheiten) und Virus (1251.E.) zugegeben.

Behandlungsdauer NE+V 30 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 50 h einschließlich 3 h Colcemidbehandlung.

Behandlung	Anzahl ausgewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
30 R	100	12	13	15	-	1	1	19
30 R+NE	100	17	19	18	-	1	-	20
30 R+NE+V	100	14	20	17	-	-	-	17
60 R	100	26	30	34	-	3	-	40
60 R+NE	100	38	79	58	4	2	-	66
60 R+NE+V	100	26	31	33	2	1	-	37
90 R	100	34	61	45	2	5	-	57
90 R+NE	100	44	101	68	4	9	-	90
90 R+NE+V	100	26	54	32	2	10	-	54
120 R	100	41	72	73	3	10	-	96
120 R+NE	100	58	145	112	7	7	-	133
120 R+NE+V	100	50	66	93	9	10	-	122

TABELLE 18 b:

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruch- rate
			Al	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
30 R	100	10	10	12	-	1	-	14
30 R+NE	100	11	26	12	1	-	-	13
60 R	100	10	33	16	-	-	-	16
60 R+NE	100	20	35	25	1	1	-	28
90 R	100	23	43	29	3	3	-	38
90 R+NE	100	37	86	59	4	5	-	73
120 R	100	38	44	68	-	3	-	74
120 R+NE	100	49	106	122	2	5	-	134

Tabelle 18c zeigt die zusammengefaßten Ergebnisse beider Versuche. Mit Ausnahme der niedrigsten Bestrahlungsdosis (30 R) wurden die achromatischen Läsionen und Chromatidbrüche durch die NE-Nachbehandlung annähernd verdoppelt. Chromatidentranslokationen konnten durch die NE-Behandlung nicht vermehrt induziert werden. Dizentrische-und Ringchromosomen wurden nicht gefunden.

TABELLE 18 c:

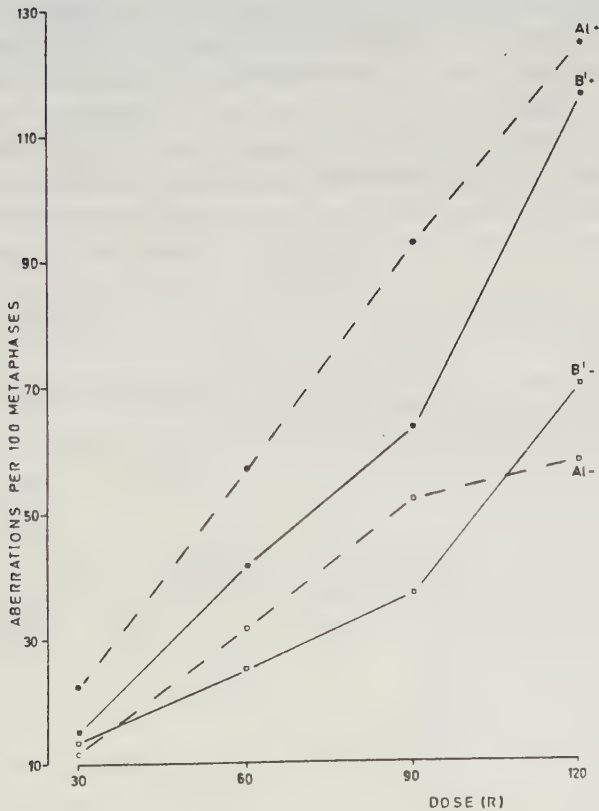
Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruch- rate
			Al	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
30 R	200	11,0	11,5	13,5	-	1,0	0,5	16,5
30 R+NE	200	14,0	22,5	15,0	0,5	-	16,5	16,5
60 R	200	18,0	31,5	25,0	-	1,5	-	28,0
60 R+NE	200	29,0	57,0	41,5	2,5	1,5	-	47,0
90 R	200	28,5	52,0	37,0	2,5	4,0	-	47,5
90 R+NE	200	40,5	93,5	63,5	4,0	7,0	-	81,5
120 R	200	39,5	58,0	70,5	1,5	6,5	-	85,0
120 R+NE	200	53,5	125,5	117,0	4,5	6,0	-	133,5

ABBILDUNG 3:

Chromatidbrüche und achromatische Läsionen in menschlichen Lymphozyten nach Röntgenbestrahlung und NE-Nachbehandlung in G2.

Die Abbildung zeigt die Daten aus Tabelle 18c.

- A1 - = Achromatische Läsionen in bestrahlten Kulturen
A1 + = Achromatische Läsionen in bestrahlten und NE nachbehandelten Kulturen
B' - = Chromatidbrüche in bestrahlten Kulturen
B' + = Chromatidbrüche in bestrahlten und mit NE nachbehandelten Kulturen



Zusätzlich wurde untersucht, ob Röntgenstrahlen induzierte Läsionen nur unmittelbar nach der G2-Bestrahlung oder auch nach einer längeren Erholungszeit durch die NE-Zugabe beeinflußt werden können (Tab. 19). Die Zellen wurden zur 46. Kulturstunde bestrahlt. Die Zeit zwischen Bestrahlung und NE-Zugabe wurde als Erholungszeit definiert. Vor der NE-Behandlung wurden die Kulturen zentrifugiert und das Medium abgehoben. Die NE-Behandlung wurde entweder sofort nach der Bestrahlung für 30 Minuten bei 37°C durchgeführt (0-30 Min.) oder es lag eine Erholungszeit von 30 Minuten (30-60 Min.), 60 Minuten (60-90 Min.), 90 Minuten (90-120 Min.) zwischen Bestrahlung und NE-Zugabe. Nach dem Ende der NE-Behandlung wurde Colcemid zugegeben, da alle Kulturen gleichzeitig fixiert wurden, betrug die Dauer der Colcemidbehandlung 180, 150, 120 oder 90 Minuten. Zu allen Erholungszeiten wurde eine Kultur mit 100 R bestrahlt, die Vergleichskultur wurde ebenfalls bestrahlt und zusätzlich mit NE nachbehandelt. Die Bruchrate wurde für alle bestrahlten Kulturen gemittelt und betrug 31,3. Nachbehandlung mit NE direkt nach der Bestrahlung verdreifachte die Bruchrate. Nach einer Erholungszeit von 30 Minuten oder 60 Minuten war die Bruchrate in NE-behandelten Kulturen fünfmal höher als in nur bestrahlten Kulturen. Wurde die NE-Behandlung 90-120 Minuten nach der Bestrahlung durchgeführt, wurden keine auswertbaren Mitosen gefunden.

TABELLE 19:

EINFLUSS EINER G2-NACHBEHANDLUNG MIT NE AUF RÖNTGENSTRAHLEN INDUZIERTER STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN

Die Zellen wurden zur 46. Kulturstunde bestrahlt. Die NE-Zugabe erfolgte sofort, nach 30, 60 und 90 Minuten.

Behandlungsdauer NE 30 Minuten bei 37°C, NE-Konzentration 4-8 Einheiten
Kulturdauer 50 h

Behandlung	NE Behand- lung (min)	Colcemid- behand- lung (min.)	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen				Bruch- rate
					A1	B'	B''	RB'	
100 R	-	90-180	300	23,7	14,7	28,0	0,7	1,3	31,3
100 R+NE	0-30	180	100	35,0	44,0	79,0	4,0	5,0	93,0
100 R+NE	30-60	150	100	64,0	87,0	144,0	7,0	11,0	173,0
100 R+NE	60-90	120	90	64,4	37,7	144,4	11,1	4,4	164,3

1.4. Bleomycin (BLM)

1.4.1. G₀-Behandlung mit BLM, NE und V

Vollblut wurde für 30 Minuten bei 37 °C mit BLM behandelt. Im ersten Experiment wurden NE und BLM gleichzeitig zugegeben (Tab.20). In allen getesteten BLM-Konzentrationen wurde eine Beeinflussung der Aberrationsrate durch die NE-Behandlung gefunden. Bei einer BLM-Konzentration von 20 µg/ml wurde die Bruchrate durch die NE-Zugabe vervierfacht, Ursache ist ein vermehrtes Auftreten von Chromatiden- und Chromosomenaberrationen.

TABELLE 20:

EINFLUSS EINER GLEICHZEITIGEN G₀-BEHANDLUNG MIT BLM UND NE AUF DIE RATE STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN

Das Vollblut wurde für 30 Minuten gleichzeitig mit BLM und NE (4-8 Einh.) bei Zimmertemperatur behandelt (Pulsbehandlung).

Kulturdauer 50 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung

Behandlung	Anzahl ausgewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A)	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
10 µg/ml	100	9,0	5,0	5,0	4,0	-	-	9,0
10 µg/ml+NE	100	9,0	10,0	4,0	-	1,0	4,0	14,0
20 µg/ml	100	5,0	9,0	2,0	2,0	-	2,0	8,0
20 µg/ml+NE	100	17,0	19,0	12,0	4,0	-	8,0	32,0
50 µg/ml	100	16,0	4,0	8,0	6,0	-	7,0	28,0
50 µg/ml+NE	100	36,0	15,0	23,0	14,0	3,0	19,0	81,0

In einem weiteren Experiment wurden die Zellen für 30 Minuten mit BLM behandelt, anschließend wurde NE zugegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Auch die NE-Nachbehandlung hatte eine deutlich vermehrte Aberrationsrate zur Folge. Bei einer BLM-Konzentration von 50 µg/ml lag die Bruchrate bei 19,0, durch die NE-Behandlung wurde sie auf 65,0 gesteigert (Tab.21).

TABELLE 21:

EINFLUSS EINER GO-NACHBEHANDLUNG MIT NE AUF BLM INDUZIERT E STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN

Das Vollblut wurde für 30 Minuten bei 37° C mit BLM behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden 4-8 Einheiten NE zugegeben; Behandlungsdauer NE 30 Min. bei 37° C. Kulturdauer 50 h, einschließlich 5 h Colcemidbehandlung

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruch- rate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
10µg/ml BLM	100	8,0	5,0	6,0	3,0	-	-	9,0
10µg/ml BLM+NE	100	6,0	10,0	4,0	2,0	-	-	6,0
20 µg/ml BLM	100	6,0	9,0	3,0	3,0	-	1,0	8,0
20 µg/ml BLM+NE	51	14,0	8,0	8,0	8,0	-	-	16,0
50 µg/ml BLM	100	11,0	5,0	5,0	8,0	-	3,0	19,0
50 µg/ml BLM+NE	100	30,0	3,0	14,0	11,0	-	20,0	65,0

In zwei weiteren Experimenten wurde Vollblut mit folgenden BLM-Konzentrationen behandelt: 20, 50, 100 oder 150 µg/ml. Nach 45 Minuten wurde das BLM ausgewaschen und NE zugegeben. In beiden Versuchen konnte keine Beeinflussung der Aberrationsrate durch die NE-Nachbehandlung gefunden werden.

Zusätzlich wurde eine Kultur pro Konzentration mit NE+V nachbehandelt. Auch hierbei lagen die Aberrationsraten nicht höher als in vergleichbaren Kulturen, die nur mit BLM behandelt worden waren. (Tab. 22a, b).

TABELLE 22 a:

EINFLUSS EINER GO-NACHBEHANDLUNG MIT NE UND VIRUS AUF BLM INDUZIERTER STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN

Vollblut wurde für 45 Minuten bei Zimmertemperatur mit BLM behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden NE (4-8 Einh.) und Virus (125 I.E.) zugegeben.

Behandlungsdauer NE+V 15 Minuten in Eis, 15 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 50 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung

Behandlung	Anzahl ausgewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
20 µg/ml BLM	100	9,0	5,0	4,0	-	-	4,0	12,0
20 µg/ml BLM+NE	100	8,0	5,0	6,0	5,0	-	-	11,0
20 µg/ml BLM+NE+V	100	9,0	6,0	10,0	4,0	-	1,0	16,0
50 µg/ml BLM	100	12,0	9,0	8,0	5,0	-	4,0	21,0
50 µg/ml BLM+NE	100	23,0	3,0	19,0	12,0	-	5,0	41,0
50 µg/ml BLM+NE+V	100	11,0	4,0	9,0	5,0	-	1,0	16,0
100 µg/ml BLM	100	19,0	7,0	13,0	13,0	-	5,0	36,0
100 µg/ml BLM+NE	100	15,0	5,0	10,0	16,0	-	1,0	28,0
100 µg/ml BLM+NE+V	-	-	-	-	-	-	-	-
150 µg/ml BLM	100	29,0	9,0	21,0	17,0	-	11,0	60,0
150 µg/ml BLM+NE	100	18,0	7,0	13,0	9,0	-	5,0	32,0
150 µg/ml BLM+NE+V	59	12,0	4,5	7,0	12,3	-	3,7	27,0
K0	100	0,0	1,0	-	-	-	-	0,0

TABELLE 22 b:

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruch- rate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
20 µg/ml BLM	100	7,0	3,0	3,0	5,0	-	3,0	14,0
20 µg/ml BLM+NE	100	4,0	2,0	1,0	11,0	-	-	12,0
20 µg/ml BLM+NE+V	100	12,0	1,0	7,0	6,0	-	1,0	15,0
50 µg/ml BLM	100	12,0	2,0	4,0	11,0	-	-	12,0
50 µg/ml BLM+NE	100	2,0	5,0	-	9,0	-	5,0	19,0
50 µg/ml BLM+NE+V	100	8,0	3,0	3,0	5,0	-	1,0	10,0
100 µg/ml BLM	100	14,0	2,0	4,0	14,0	-	4,0	26,0
100 µg/ml BLM+NE	100	6,0	-	4,0	2,0	-	-	6,0
100 µg/ml BLM+NE+V	100	13,0	4,0	11,0	4,0	-	-	15,0
150 µg/ml BLM	100	21,0	3,0	6,0	15,0	1,0	7,0	37,0
150 µg/ml BLM+NE	100	21,0	3,0	11,0	15,0	-	6,0	38,0
150 µg/ml BLM+NE+V	100	14,0	1,0	9,0	12,0	-	1,0	23,0
K0	100	0,0	-	-	-	-	-	0,0

Tabelle 22c zeigt die zusammengefaßten Daten aus den-Tabellen 22a und b. Die Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Vorversuchen (Tab.20,21), obwohl die Behandlungsbedingungen in allen Experimenten ähnlich waren.

TABELLE 22 c:

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruch- rate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
20 µg/ml BLM	200	8,0	4,0	3,5	2,5	-	1,0	8,0
20 µg/ml BLM+NE	200	6,0	3,5	3,5	8,0	-	0,0	11,5
50 µg/ml BLM	200	12,0	5,5	6,0	8,5	-	3,0	20,5
50 µg/ml BLM+NE	200	12,5	4,0	9,5	10,5	-	5,0	30,0
100 µg/ml BLM	200	16,5	4,5	8,5	13,5	-	4,5	31,0
100 µg/ml BLM+NE	200	10,5	2,5	7,5	9,0	-	0,5	17,5
150 µg/ml BLM	200	25,0	6,0	13,5	16,0	0,5	9,0	48,5
150 µg/ml BLM+NE	200	19,5	5,0	12,0	12,0	-	5,5	35,0
K0	200	0,0	-	-	-	-	-	0,0

1.4.2. G1-Behandlung mit BLM, NE und V

Die Lymphozyten wurden zur 20. Kulturstunde für 45 Minuten bei Zimmertemperatur mit folgenden BLM-Konzentrationen behandelt: 20, 50, 100 und 150 µg/ml. Unmittelbar nach der BLM-Behandlung wurde das Zellsediment mit NE nachbehandelt. Dieser Versuchsansatz wurde dreimal unter gleichen Bedingungen wiederholt (Tab. 23a, b, c). Auffällig ist, daß in allen Versuchen keine dosisabhängige Steigerung der Bruchrate in BLM behandelten Kulturen gefunden wurde. Die NE-Nachbehandlung erbrachte unterschiedliche Ergebnisse: Eine Steigerung der Bruchrate wurde ebenso gefunden wie eine Verminderung oder eine fehlende Beeinflussung. Ein systematischer Zusammenhang konnte nicht festgestellt werden.

TABELLE 23 a:

EINFLUSS EINER G1-NACHBEHANDLUNG MIT NE UND VIRUS AUF BLM INDUZIERTER STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN

Die Zellen wurden zur 20. Kulturstunde für 45 Minuten bei Zimmertemperatur mit BLM behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden NE (4-8 Einh.) und Virus (125 I.E.) zugegeben

Behandlungsdauer NE+V 15 Minuten in Eis, 15 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 50 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung

Behandlung	Anzahl ausgewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
20 µg/ml BLM	300	15,7	2,3	6,7	11,3	-	3,3	24,6
20 µg/ml BLM+NE	218	22,8	7,8	16,5	15,1	0,5	3,2	38,8
20 µg/ml BLM+NE+V	256	21,5	1,2	9,4	9,8	-	14,1	33,3
50 µg/ml BLM	100	16,0	2,0	13,0	10,0	-	2,0	27,0
50 µg/ml BLM+NE	76	21,0	5,3	11,8	22,4	-	5,3	44,8
50 µg/ml BLM+NE+V	76	13,2	5,3	2,6	11,8	-	3,9	22,2
100 µg/ml BLM	100	9,0	3,0	6,0	9,0	-	1,0	15,0
100 µg/ml BLM+NE	19	21,1	10,5	10,5	31,6	-	10,5	63,1
100 µg/ml BLM+NE+V	48	8,3	2,1	-	2,1	-	8,3	18,7
150 µg/ml BLM	100	19,0	8,0	17,0	16,0	-	1,0	35,0
150 µg/ml BLM+NE	18	11,1	-	5,5	11,1	-	-	16,6
150 µg/ml BLM+NE+V	45	15,6	2,2	13,3	8,9	-	2,2	26,6
K0	100	1,0	-	1,0	-	-	-	1,0

TABELLE 23 b:

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruch- rate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
20 µg/ml BLM	100	22,0	6,0	24,0	13,0	-	6,0	49,0
20 µg/ml BLM+NE	100	18,0	4,0	9,0	12,0	-	4,0	29,0
20 µg/ml BLM+NE+V	100	13,0	3,0	8,0	5,0	-	2,0	17,0
50 µg/ml BLM	100	17,0	3,0	14,0	14,0	-	3,0	34,0
50 µg/ml BLM+NE	100	24,0	10,0	11,0	12,0	-	10,0	43,0
50 µg/ml BLM+NE+V	100	18,0	4,0	14,0	5,0	-	7,0	33,0
100 µg/ml BLM	100	20,0	21,0	19,0	19,0	-	4,0	46,0
100 µg/ml BLM+NE	100	29,0	13,0	34,0	12,0	-	7,0	60,0
100 µg/ml BLM+NE+V	100	15,0	8,0	19,0	-	-	6,0	31,0
150 µg/ml BLM	100	24,0	11,0	15,0	20,0	-	6,0	47,0
150 µg/ml BLM+NE	61	17,0	7,0	25,0	6,0	-	7,0	45,0
150 µg/ml BLM+NE+V	100	23,0	17,0	20,0	6,0	-	23,0	72,0
K0	100	2,0	3,0	2,0	-	-	-	-

TABELLE 23 c:

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruch- rate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
20 µg/ml BLM	100	20,0	4,0	18,0	4,0	-	2,0	26,0
20 µg/ml BLM+NE	100	21,0	5,0	17,0	3,0	-	2,0	24,0
50 µg/ml BLM	100	16,0	13,0	9,0	9,0	-	3,0	24,0
50 µg/ml BLM+NE	100	25,0	9,0	7,0	15,0	-	5,0	32,0
100 µg/ml BLM	100	51,0	31,0	79,0	9,0	-	4,0	96,0
100 µg/ml BLM+NE	100	40,0	18,0	36,0	4,0	-	-	40,0
150 µg/ml BLM	100	27,0	6,0	18,0	12,0	-	6,0	42,0
150 µg/ml BLM+NE	50	22,0	6,0	-	4,0	30	-	-
K0	100	0,0	2,0	-	-	-	-	0,0

Tabelle 23d faßt die Ergebnisse der Tabellen 23a-c zusammen. Es konnte kein dosisabhängiges Ansteigen der Aberrationsrate nach der BLM-Behandlung gefunden werden, die NE-Nachbehandlung bleibt ohne Einfluß auf BLM induzierte Aberrationen.

TABELLE 23 d:

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in					Bruch- rate
			A'	B'	B''	100 Mitosen RB'	Dic+Ring	
20 µg/ml BLM	500	17,8	3,4	12,4	8,2	-	3,6	27,8
20 µg/ml BLM+NE	418	21,1	6,2	14,8	11,5	0,2	3,1	32,9
50 µg/ml BLM	300	16,3	6,0	12,0	11,0	-	2,7	28,4
50 µg/ml BLM+NE	276	23,5	8,3	9,8	16,0	-	6,9	39,6
100 µg/ml BLM	300	26,7	18,3	34,7	12,3	-	3,0	53,0
100 µg/ml BLM+NE	219	33,3	33,0	32,9	7,3	-	4,1	48,4
150 µg/ml BLM	300	23,3	8,3	16,7	16,0	-	4,3	41,0
150 µg/ml BLM+NE	129	18,1	5,6	18,6	6,7	-	4,9	35,1
K0	300	1,0	1,7	1,0	-	-	-	-

1.4.3. G2-Behandlung mit BLM, NE und V

In einem Vorversuch sollten die günstigsten Bedingungen für eine NE-Behandlung ermittelt werden (Tab.24). Die Zellen wurden zur 45. Kulturstunde für 45 Minuten mit 20 µg/ml BLM behandelt, anschließend erfolgte die NE-Zugabe auf das Zellsediment. Nachbehandlung für 15 Minuten in Eis und 15 Minuten bei 37°C erwies sich am wirksamsten. Unter diesen Behandlungsbedingungen wurden in BLM-behandelten Kulturen 51 B', in mit NE-nachbehandelten 70 B' und in mit NE+V nachbehandelten 123 B', jeweils in 100 Mitosen, gefunden. Die übrigen Behandlungsbedingungen hatten entweder keinen Einfluß auf die BLM induzierte Aberrationsrate (30 Min. in Eis oder 30 Min. bei Zimmertemperatur) oder es wurde nur ein geringer Anstieg gefunden (30 Min. bei 37°C; 30 Min. in Eis, 30 Min. bei 37°C). Auffällig sind die großen Schwankungen in der Anzahl aberranter Mitosen bei BLM behandelten Kulturen. Inkubation für 30 Minuten in Eis nach der BLM-Behandlung hat 39,9% aberrante Mitosen zur Folge, erfolgt die Inkubation für 30 Minuten bei Zimmertemperatur, werden nur 24% aberrante Mitosen gefunden.

TABELLE 24:

Einfluss einer G2-Nachbehandlung mit NE und Virus auf BLM induzierte strukturelle Aberrationen in Leukozytenkulturen

Die Zellen wurden zur 45. Kulturstunde für 45 Minuten bei Zimmertemperatur mit BLM behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden NE (4-8 Einh.) und Virus (125 I.E.) zugegeben.

Konzentration BLM 20 µg/ml

Kulturdauer 50 h einschließlich 4 h Colcemidbehandlung

Behandlung	Behandlungsdauer NE+V	Anzahl ausgewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen	Al	B'	B''	RB'	Dic+Ring	Bruchrate
BLM	30Min.in	153	39,9	30,1	60,1	3,3	1,4	-	-	66,2
BLM+NE	Eis	100	27,0	11,0	37,0	-	-	-	-	37,0
BLM+NE+V		200	29,0	29,0	42,5	4,0	1,0	-	-	48,5
BLM	30Min.bei	100	24,0	33,0	36,0	3,0	-	-	-	39,0
BLM+NE	Zimmer-	100	21,0	11,0	31,0	4,0	-	-	-	35,0
BLM+NE+V	temperatur	100	26,0	23,0	39,0	1,0	-	-	-	40,0
BLM	30Min.bei	139	26,6	16,5	39,6	2,2	-	-	-	41,8
BLM+NE	37° C	161	31,7	26,7	46,6	1,2	1,2	-	-	50,2
BLM+NE+V		200	34,5	27,5	53,0	6,0	1,0	0,5	-	62,0
BLM	15Min.Eis,	100	33,0	33,0	51,0	9,0	-	-	-	60,0
BLM+NE	15Min.37°C	100	41,0	56,0	70,0	13,0	1,0	-	-	85,0
BLM+NE+V		100	45,0	105,0	123,0	7,0	-	-	-	130,0
BLM	30Min.Eis,	183	33,9	26,2	45,4	6,6	0,6	0,6	-	54,4
BLM+NE	30Min.37°C	200	29,5	26,5	50,5	4,5	1,5	-	-	58,0
BLM+NE+V		266	35,0	39,5	56,0	5,3	-	-	-	61,3

In den folgenden Experimenten wurden die Lymphozyten zur 45. Kulturstunde mit BLM behandelt. Anschließend wurde das Zellsediment mit NE und mit NE+V nachbehandelt (Tab. 25a,b). Bei allen BLM-Konzentrationen konnte die Anzahl der Chromatidbrüche durch die NE-Nachbehandlung mindestens verdoppelt werden. Chromosomenaberrationen traten nach der NE-Behandlung nicht vermehrt auf.

TABELLE 25 a:

EINFLUSS EINER G₂-NACHBEHANDLUNG MIT NE UND VIRUS AUF BLM INDUZIERTES STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN.

Die Zellen wurden zur 45. Kulturstunde für 45 Minuten mit BLM behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden NE (4-8 Ein.) und Virus (125 I.E.) zugegeben.

Behandlungsdauer NE+V 15 Minuten in Eis, 15 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 50 h einschließlich 4 h Colcemidbehandlung

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen				Bruch- rate
			A1	B'	B''	RB'	
20 µg/ml BLM	100	19	19	26	-	-	26
20 µg/ml BLM+NE	100	32	30	59	1	2	64
20 µg/ml BLM+NE+V	100	33	34	71	2	-	73
50 µg/ml BLM	100	26	21	31	1	-	32
50 µg/ml BLM+NE	100	41	44	80	1	1	83
50 µg/ml BLM+NE+V	100	38	43	73	1	3	80
100 µg/ml BLM	100	27	21	41	-	-	41
100 µg/ml BLM+NE	100	44	54	92	2	2	98
100 µg/ml BLM+NE+V	100	40	56	93	1	4	102
150 µg/ml BLM	100	38	53	65	-	-	65
150 µg/ml BLM+NE	36	56	94	153	-	-	153
150 µg/ml BLM+NE+V	-	-	-	Keine Mitosen			
KO	100	0	2	-	-	-	0

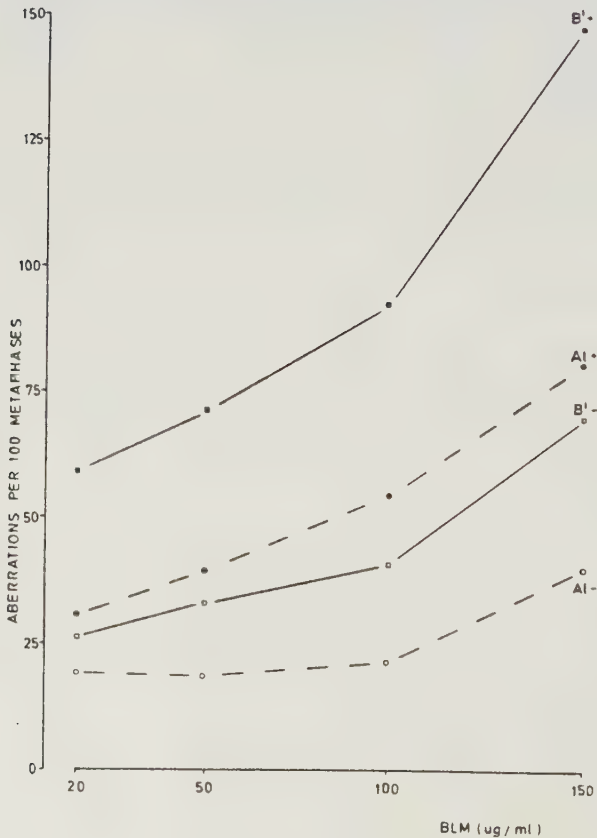
TABELLE 25 b:

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen				Bruch- rate
			A1	B'	B''	RB'	
50 µg/ml BLM	100	24,0	16,0	34,0	-	-	34,0
50 µg/ml BLM+NE	100	32,0	35,0	62,0	-	1,0	64,0
50 µg/ml BLM+NE+V	100	42,0	46,0	72,0	1,0	5,0	83,0
150 µg/ml BLM	100	41,0	26,0	74,0	-	-	74,0
150 µg/ml BLM+NE	100	51,0	56,0	141,0	-	2,0	145,0
150 µg/ml BLM+NE+V	-	-	-	keine Mitosen			
KO	100	0,0	2,0	-	-	-	0,0

ABBILDUNG 4:

Achromatische Läsionen und Chromatidbrüche in menschlichen Lymphozyten nach BLM-Behandlung und NE-Nachbehandlung in der G₂-Phase des Zellzyklus. Die Abbildung zeigt die zusammengefaßten Daten aus Tabelle 25a,b.

- Al - = Achromatische Läsionen in BLM behandelten Kulturen
Al + = Achromatische Läsionen in BLM behandelten und NE-nachbehandelten Kulturen
B' - = Chromatidbrüche in BLM behandelten Kulturen
B' + = Chromatidbrüche in BLM behandelten und NE-nachbehandelten Kulturen



In einem weiteren Experiment wurde die NE-Wirkung auf stark geschädigte Zellen untersucht (Tab.26). Anstatt der Pulsbehandlung wurde eine 5 stündige Dauerbehandlung von der 45. Kulturstunde an durchgeführt. Außerdem wurden die Zellen während der NE-Behandlung bei 39°C inkubiert. Die BLM-Aktivität ist bei dieser Temperatur um ein Vielfaches höher als bei Zimmertemperatur. Bei allen getesteten BLM-Konzentrationen (2, 10 und 20 µg/ml) wurde eine deutliche Steigerung der Bruchrate durch die NE-Behandlung induziert.

TABELLE 26:

EINFLUSS EINER GLEICHZEITIGEN G2-BEHANDLUNG MIT BLM UND NE AUF DIE RATE STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN.

Die Zellen wurden zur 45. Kulturstunde mit BLM behandelt (Dauerbehandlung).

Nach 15 Minuten wurden 4-8 Einheiten NE zugegeben.

Behandlungsdauer NE 15 Minuten bei 39° C

Kulturdauer 50 h einschließlich 4 h Colcemidbehandlung.

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
2 µg/ml BLM	200	45,5	37,0	90,0	8,0	-	-	98,0
2 µg/ml BLM+NE	80	53,8	52,2	141,1	3,8	-	-	144,9
10 µg/ml BLM	112	63,8	59,6	125,5	6,4	-	-	131,9
10 µg/ml BLM+NE	141	67,9	121,4	180,1	17,9	-	-	198,0
20 µg/ml BLM	134	45,5	64,2	104,5	3,7	0,8	-	109,8
20 µg/ml BLM+NE	148	49,3	90,5	162,2	6,1	0,7	-	169,7
K0	100	3,0	5,0	2,0	1,0	-	-	3,0

Lymphozyten wurden im Ficoll-Dichtegradienten isoliert und zur 45. Kulturstunde mit BLM behandelt (Tab.27). Anschließend wurde das Zellsediment mit NE oder NE+V nachbehandelt. Sowohl Nachbehandlung mit NE als auch Nachbehandlung mit NE+V hatte einen deutlichen Anstieg der Bruchrate zur Folge.

TAUILL 27

EINFLUSS EINER G2-NACHBEHANDLUNG MIT NE UND VIRUS AUF DIE RATE BLM INDUZIERTER STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN ISOLIERTEN LEUKOZYTEN.

Die Zellen wurden zur 45. Kulturstunde für 30 Minuten mit BLM (20 µg/ml) behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden 4-8 Einheiten NE und 125 I.E. Virus zugegeben. Behandlungsdauer NE+V 15 Minuten in Eis, 15 Minuten bei 37° C
Kulturdauer 50 h einschließlich 4 h Colcemidbehandlung.

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
BLM	100	23,0	19,0	23,0	4,0	-	-	27,0
BLM+NE	100	26,0	36,0	37,0	5,0	-	-	42,0
BLM+NE+V	100	24,0	28,0	52,0	8,0	-	-	60,0
K0	100	4,0	5,0	2,0	2,0	-	-	0,0

1.5. Methylmethansulfonat (MMS)

1.5.1. G1-Behandlung mit MMS, NE und V

Es wurden zwei unterschiedliche Versuchsansätze durchgeführt:

(a) Pulsbehandlung: Die Zellen wurden zur 20. Kulturstunde für 60 Minuten mit MMS behandelt. Im Anschluß daran wurde das Zellsediment mit NE nachbehandelt (Tab.28). Die MMS-Behandlung erfolgte mit folgenden Konzentrationen: $1 \times 10^{-4} \text{M}$, $5 \times 10^{-4} \text{M}$ und $1 \times 10^{-3} \text{M}$. Bei einer Konzentration von $5 \times 10^{-3} \text{M}$ wirkte MMS toxisch. Durch die MMS-Behandlung wurden auch in der höchsten getesteten Konzentration nur 2% aberrante Mitosen induziert. Durch Nachbehandlung mit NE konnte die Rate bis auf 7% gesteigert werden. Sowohl Chromatiden-als auch Chromosomenaberrationen traten nach der NE-Behandlung vermehrt auf.

TABELLE 28:

EINFLUSS EINER G1-NACHBEHANDLUNG MIT NE AUF DIE MMS INDUZIERTER RATE STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN.

Die Zellen wurden zur 20. Kulturstunde für 60 Minuten mit MMS behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden 2-4 oder 4-8 Einheiten NE zugegeben.

Behandlungsdauer NE 15 Minuten in Eis, 15 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 50 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung.

Behandlung	Anzahl ausgewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
$1 \times 10^{-4} \text{M}$	100	2,0	2,0	1,0	1,0	-	-	2,0
$1 \times 10^{-4} \text{M} + 2-4 \text{E. NE}$	100	2,0	3,0	2,0	-	-	-	2,0
$1 \times 10^{-4} \text{M} + 4-8 \text{E. NE}$	100	2,0	6,0	1,0	1,0	-	-	2,0
$5 \times 10^{-4} \text{M}$	200	0,0	1,0	-	-	-	-	0,0
$5 \times 10^{-4} \text{M} + 2-4 \text{E. NE}$	200	2,0	2,5	0,5	1,0	-	0,5	2,5
$5 \times 10^{-4} \text{M} + 4-8 \text{E. NE}$	200	2,5	3,0	0,5	0,5	0,5	1,0	4,0
$1 \times 10^{-3} \text{M}$	200	2,0	5,0	1,0	0,5	-	0,5	2,5
$1 \times 10^{-3} \text{M} + 2-4 \text{E. NE}$	300	7,0	4,7	2,0	1,0	2,7	2,0	12,4
$1 \times 10^{-3} \text{M} + 4-8 \text{E. NE}$	200	4,5	2,0	2,5	-	-	2,0	6,5
K0	200	0,5	1,0	0,5	-	-	-	0,5

(b) Dauerbehandlung: Die Lymphozyten wurden zur 20. Kulturstunde im Pellet mit MMS behandelt, nach 15 Minuten wurden NE oder NE+V zugegeben (Tab. 29a). Nur in der höchsten getesteten MMS-Konzentration ($1 \times 10^{-4} \text{ M}$) wurde die Aberrationsrate durch die Behandlung mit NE+V gesteigert, sowohl Chromatiden- als auch Chromosomenaberrationen traten vermehrt auf. In einem weiteren Experiment wurden die Zellen nur noch mit der höchsten MMS-Konzentration behandelt. NE-Zugabe führte zu einer Verdopplung der Aberrationsrate (Tab. 29b).

TABELLE 29 a:

EINFLUSS EINER GLEICHZEITIGEN G1-BEHANDLUNG MIT MMS, NE UND VIRUS AUF DIE RATE STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN.
Die Zellen wurden zur 20. Kulturstunde mit MMS behandelt und für 15 Minuten in Eis inkubiert. Anschließend wurden 4-8 Einheiten NE und 125 I.E. Virus zugegeben.
Behandlungsdauer MMS 30 Stunden
Behandlungsdauer NE+V 15 Minuten in Eis, 15 Minuten bei 37° C
Kulturdauer 50 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
$1,0 \times 10^{-6} \text{ M}$	200	0,5	1,5	-	-	-	-	0,0
$1,0 \times 10^{-6} \text{ M} + \text{NE}$	200	2,5	5,0	1,5	1,0	-	-	2,5
$1,0 \times 10^{-6} \text{ M} + \text{NE} + \text{V}$	200	3,0	4,5	1,0	3,5	-	-	4,5
$1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$	200	0,0	1,5	-	-	-	-	0,0
$1,0 \times 10^{-5} \text{ M} + \text{NE}$	200	3,0	3,5	2,5	-	-	-	2,5
$1,0 \times 10^{-5} \text{ M} + \text{NE} + \text{V}$	200	3,0	6,5	2,0	1,0	-	-	3,0
$1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$	100	5,0	2,0	4,0	1,0	-	-	5,0
$1,0 \times 10^{-4} \text{ M} + \text{NE}$	68	4,4	4,4	4,4	-	-	-	4,4
$1,0 \times 10^{-4} \text{ M} + \text{NE} + \text{V}$	100	13,0	1,0	9,0	6,0	1,0	1,0	19,0
K0	100	1,0	3,0	1,0	-	-	-	1,0

TABELLE 29 b:

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
$1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$	185	10,3	7,0	4,9	2,7	2,2	0,5	13,0
$1,0 \times 10^{-4} \text{ M} + \text{NE}$	250	18,4	13,6	12,0	6,4	4,4	1,2	29,6
$1,0 \times 10^{-4} \text{ M} + \text{NE} + \text{V}$	86	22,1	10,5	10,5	8,1	2,3	2,3	27,8
K0	100	1,0	3,0	1,0	-	-	-	1,0

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Experimenten wurden Lymphozyten im Ficoll-Dichtegradienten isoliert und zur 20. Kulturstunde im Pellet mit MMS behandelt. Nach 15 Minuten wurde NE zugegeben. Die MMS-Behandlung wurde mit der höchstmöglichen Konzentration ($1 \times 10^{-5} M$) als Dauerbehandlung durchgeführt (Tab.30). MMS allein induzierte 1% aberrante Mitosen. Nach NE-Zugabe (2-4 oder 4-8 Einheiten) wurden 10% aberrante Mitosen gefunden. Die NE-Behandlung erhöhte in erster Linie die Anzahl der Chromatidbrüche, Austauschaberrationen kamen nicht vor.

TABLE 30:

EINFLUSS EINER GLEICHZEITIGEN G1-BEHANDLUNG MIT MMS UND NE AUF DIE RATE STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN ISOLIERTEN LEUKOZYTEN.

Die Zellen wurden zur 20. Kulturstunde mit MMS behandelt. Nach 15 Minuten Inkubation in Eis wurden 2-4 oder 4-8 Einheiten NE und 125 I.E. Virus zugegeben.

Behandlungsdauer MMS 30 Stunden; Konzentration $1 \times 10^{-5} M$

Behandlungsdauer NE 15 Minuten in Eis, 15 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 50 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung.

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
MMS	100	1,0	6,0	-	1,0	-	-	1,0
MMS+2-4E.NE	100	10,0	12,0	8,0	4,0	-	-	12,0
MMS+4-8E.NE	100	10,0	6,0	9,0	2,0	-	-	11,0
KO	100	0,0	-	-	-	-	-	0,0

Es wurde untersucht, ob MMS induzierte Läsionen nur unmittelbar nach Behandlungsende oder auch nach einer Erholungszeit durch die NE-Zugabe beeinflusst werden (Tab31). Die Zellen wurden zur 19. Kulturstunde mit MMS behandelt. Der Zeitraum zwischen Behandlung und NE-Zugabe wurde als Erholungszeit definiert. Vor der NE-Behandlung wurden die Kulturen zentrifugiert und das Medium abgehoben. Die NE-Behandlung wurde entweder unmittelbar nach der MMS-Behandlung für 30 Minuten bei 37 °C durchgeführt (0-30 Min.) oder nach einer Erholungszeit von 60, 120, 180 oder 300 Minuten. Die Bruchrate in MMS behandelten Kulturen ($5 \times 10^{-4} M$) lag bei 0,5. NE-Nachbehandlung (2-4 Einheiten) führte maximal zu einer Bruchrate von 6,6. Eine Abhängigkeit der Bruchrate von der Erholungszeit wurde nicht gefunden. Behandlung mit 4-8 Einheiten NE hatte eine vollständige Mitosehemmung zur Folge.

TABELLE 31:

EINFLUSS EINER GI-NACHBEHANDLUNG MIT NE AUF MMS INDUZIERT E STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN.

Die Zellen wurden zur 19. Kulturstunde für 60 Minuten mit MMS behandelt (Pulsbehandlung). Die NE-Zugabe erfolgte unmittelbar oder 60, 120, 180 oder 300 Minuten nach der Behandlung.

Konzentration MMS $5 \times 10^{-4} M$

Behandlungsdauer NE 30 Minuten bei 37 °C

Behandlung	NE-Behandlung (min.)	Anzahl ausgewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen				Bruchrate
				A1	B1	B1'		
MMS	-	200	0,5	2,0	0,5	-		0,5
MMS+1-2Einh.NE		100	2,0	2,0	2,0	-		2,0
MMS+2-4Einh.NE	0-30	100	3,0	2,0	1,0	2,0		3,0
MMS+4-8Einh.NE		-	-	keine Mitosen				
MMS+1-2Einh.NE		100	2,0	3,0	2,0	-		2,0
MMS+2-4Einh.NE	60-90	60	6,6	6,6	6,6	-		6,6
MMS+4-8Einh.NE		-	-	keine Mitosen				
MMS+1-2Einh.NE		100	4,0	2,0	4,0	-		4,0
MMS+2-4Einh.NE	120-150	50	0,0	-	-	-		0,0
MMS+4-8Einh.NE		-	-	keine Mitosen				
MMS+1-2Einh.NE		100	3,0	-	3,0	-		3,0
MMS+2-4Einh.NE	180-210	100	3,0	1,0	3,0	1,0		4,0
MMS+4-8Einh.NE		-	-	keine Mitosen				
MMS+1-2Einh.NE		53	5,6	3,6	3,6	1,8		5,4
MMS+2-4Einh.NE	300-330	40	0,0	2,5	-	-		0,0
MMS+4-8Einh.NE		-	-	keine Mitosen				

Unter ähnlichen Bedingungen wie in Tabelle 31 beschrieben, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, die MMS Konzentration betrug $1 \times 10^{-4} \text{ M}$. Die NE-Nachbehandlung erfolgte sofort (0-30 Min.), nach 120 Minuten (120-150 Min.) oder nach 300 Minuten (300-330 Min.). In mit MMS behandelten Kulturen (Tab.32) wurden keine aberranten Mitosen gefunden, in den mit NE nachbehandelten Kulturen waren maximal 3% der Mitosen aberrant. Eine Abhängigkeit der Bruchrate von der Erholungszeit wurde nicht gefunden.

TABELLE 32:

EINFLUSS EINER G1-NACHBEHANDLUNG MIT NE AUF MMS INDUZIERTER STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN IN VITRO.

Die Zellen wurden zur 19. Kulturstunde für 60 Minuten mit MMS behandelt (Pulsbehandlung). Die NE-Zugabe erfolgte unmittelbar oder 120 bzw. 300 Minuten nach der MMS-Zugabe.

Konzentration MMS $1 \times 10^{-4} \text{ M}$

Behandlungsdauer NE 30 Minuten bei 37° C

Behandlung	NE-Behandlung (min.)	Anzahl ausgewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in			100 Mitosen Bruchrate
				A1	B'	B''	
MMS	-	300	0,0	0,7	-	-	0,0
MMS+2-4Einh.NE	0-30	100	2,0	2,0	-	2,0	2,0
MMS+4-8Einh.NE		100	0,0	-	-	-	0,0
MMS+2-4Einh.NE	120-150	100	3,0	5,0	3,0	-	3,0
MMS+4-8Einh.NE		-	-	keine Mitosen			
MMS+2-4Einh.NE	300-330	100	2,0	7,0	2,0	-	2,0
MMS+4-8Einh.NE		-	-	keine Mitosen			

1.5.2. G2-Behandlung mit MMS, NE und V

(a) Pulsbehandlung: Die Zellen wurden zur 45. Kulturstunde für 60 Minuten mit MMS behandelt, unmittelbar danach wurde das Zellsediment mit NE versetzt. MMS allein induzierte maximal 4% aberrante Mitosen bei einer Konzentration von $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ (Tab.33). Auch die Nachbehandlung mit NE blieb weitgehend ohne Einfluß auf die Aberrationsrate.

TABELLE 33:

EINFLUSS EINER G2-NACHBEHANDLUNG MIT NE AUF DIE RATE MMS INDUZIERTER STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN.
Die Zellen wurden zur 45. Kulturstunde für 60 Minuten mit MMS behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend erfolgte die NE-Zugabe (2-4 oder 4-8 Einh.).
Behandlungsdauer NE 15 Minuten in Eis, 15 Minuten bei 37° C.
Kulturdauer 50 h einschließlich 4 h Colcemidbehandlung.

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			AI	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
$5 \times 10^{-4} \text{ M}$	200	1,0	3,0	1,0	-	-	-	1,0
$5 \times 10^{-4} \text{ M} + 2-4 \text{ E.NE}$	200	1,5	5,5	1,0	-	0,5	-	2,0
$5 \times 10^{-4} \text{ M} + 4-8 \text{ E.NE}$	200	2,5	3,0	2,0	0,5	-	-	2,5
$1 \times 10^{-3} \text{ M}$	200	4,0	7,0	4,0	-	-	-	4,0
$1 \times 10^{-3} \text{ M} + 2-4 \text{ E.NE}$	200	2,5	4,5	2,0	-	-	-	2,0
$1 \times 10^{-3} \text{ M} + 4-8 \text{ E.NE}$	200	3,0	8,0	3,0	-	0,5	-	3,5

(b) Dauerbehandlung: Die Lymphozyten wurden zur 45. Kulturstunde im Pellet mit MMS (1×10^{-4} M, 5×10^{-4} M) behandelt. Nach 15 Minuten wurde NE zugegeben (Tab. 34). Die höchste getestete MMS Konzentration induzierte 6% aberrante Mitosen. Auch in diesem Experiment konnte die Aberrationsrate durch die NE-Behandlung nicht gesteigert werden.

TABELLE 34:

EINFLUSS EINER GLEICHZEITIGEN G2-BEHANDLUNG MIT MMS UND NE AUF DIE RATE STRUKTURELLER ABERRATIONEN.

Die Zellen wurden zur 45. Kulturstunde mit MMS behandelt. Nach 15 Minuten Inkubation in Eis wurde NE zugegeben.

Behandlungsdauer MMS 4 Stunden (Dauerbehandlung)

Behandlungsdauer NE 15 Minuten in Eis, 15 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 50 h einschließlich 4 h Colcemidbehandlung.

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			Al	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
1×10^{-4} M	100	2,0	3,0	2,0	-	-	-	2,0
1×10^{-4} M + 2-4E.NE	100	1,0	6,0	1,0	-	-	-	1,0
1×10^{-4} M + 4-8E.NE	100	2,0	5,0	1,0	1,0	-	-	2,0
5×10^{-4} M	100	6,0	25,0	6,0	-	-	-	6,0
5×10^{-4} M + 2-4E.NE	81	7,4	13,5	7,4	-	-	-	7,4
5×10^{-4} M + 4-8E.NE	37	5,4	21,6	5,4	-	-	-	5,4
K0	100	0,0	6,0	-	-	-	-	0,0

(c) Isolierte Lymphozyten (Dauerbehandlung): Zusätzlich zu den oben beschriebenen Experimenten wurden Lymphozyten im Ficoll-Dichtegradienten isoliert. Das Zellsediment wurde zur 45. Kulturstunde mit MMS behandelt (Tab.35) und 15 Minuten später mit NE versetzt. Die MMS-Behandlung wurde mit der höchstmöglichen Konzentration als Dauerbehandlung durchgeführt. MMS allein induzierte 3% aberrante Mitosen, NE-Zugabe hatte 9% aberrante Mitosen zur Folge. Ursache dieser erhöhten Aberrationsrate ist ein vermehrtes Auftreten von Chromatidbrüchen.

TABELLE 35:

EINFLUSS EINER GLEICHZEITIGEN G2-BEHANDLUNG MIT MMS UND NE AUF DIE RATE STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN.

Die Zellen wurden zur 45. Kulturstunde mit MMS behandelt. Nach 15 Minuten Inkubation in Eis wurden 2-4 oder 4-8 Einheiten NE zugegeben.

Behandlungsdauer MMS 4 Stunden (Dauerbehandlung); Konzentration 1×10^{-4} M

Behandlungsdauer NE 15 Minuten in Eis, 15 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 50 h einschließlich 4 h Colcemidbehandlung.

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
MMS	100	3,0	7,0	2,0	1,0	-	-	3,0
MMS+2-4E.NE	100	5,0	9,0	3,0	2,0	-	-	5,0
MMS+4-8E.NE	100	9,0	19,0	8,0	1,0	-	-	9,0
KO	100	2,0	8,0	2,0	-	-	-	2,0

1.6. Diepoxybutan (DEB)

1.6.1. G1-Behandlung mit DEB, NE und V

Das Zellsediment wurde zur 20. Kulturstunde mit DEB behandelt (Dauerbehandlung). 15 Minuten danach wurde NE zugegeben. In der getesteten Konzentration ($1,3 \times 10^{-5} \text{M}$) verzögert DEB den Zellzyklus, deshalb wurde die Kulturzeit auf 72 Stunden verlängert. Um sicherzustellen, daß nur erste Mitosen nach Kulturansatz auf strukturelle Aberrationen ausgewertet werden, wurde gleichzeitig mit NE und V auch BUDR zugegeben. Zuerst wurde die NE-Wirkung bei verschiedenen Behandlungsbedingungen getestet (Tab.36). DEB allein induzierte 8% bis 12% aberrante Mitosen. Durch NE-Zugabe wurde diese Rate bei allen Behandlungsbedingungen mindestens verdoppelt, die Anzahl der Chromatidbrüche konnte teilweise bis auf das sechsfache gesteigert werden.

TABELLE 36:

EINFLUSS EINER GLEICHZEITIGEN G1-BEHANDLUNG MIT DEB, NE UND V AUF DIE RATE STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN BUDR-MARKIERTEN LEUKOZYTENKULTUREN.

Die Zellen wurden zur 20. Kulturstunde mit DEB behandelt. Nach 15 Minuten Inkubation in Eis wurden 4-8 Einheiten DEB und 125 I.E. Virus zugegeben.

Konzentration DEB $1,3 \times 10^{-5} \text{M}$; Behandlungsdauer 52 h

Kulturdauer 72 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung

Behandlung	Behandlungs- dauer NE+V	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruch- rate
				A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
DEB		200	12,0	7,5	8,5	3,0	1,5	-	14,5
DEB+V	15 Min. Eis,	200	13,0	11,0	12,0	1,0	2,5	-	18,0
DEB+NE	15 Min. 37°C	200	22,5	18,0	17,5	5,5	5,0	-	33,0
DEB+NE+V		200	27,0	9,5	22,5	5,5	7,0	-	42,0
DEB		200	11,0	8,5	7,5	1,5	3,5	-	16,0
DEB+V	30 Min. bei	200	17,0	8,0	14,0	-	5,5	-	25,0
DEB+NE	37°C	192	38,0	17,7	38,5	3,1	13,0	-	67,6
DEB+NE+V		82	31,7	24,4	20,7	1,2	22,0	-	65,9
DEB		200	8,0	5,5	8,0	0,5	0,5	0,5	10,5
DEB+V	60 Min. bei	200	10,0	6,5	5,5	1,5	3,5	-	14,0
DEB+NE	37°C	135	28,9	9,6	25,2	2,2	5,9	-	39,2
DEB+NE+V		140	22,1	16,4	20,0	2,1	4,3	0,7	32,1
DEB		200	9,0	5,0	6,0	0,5	4,0	-	14,5
DEB+V	30 Min. bei	200	13,0	7,5	9,5	1,0	4,0	-	18,5
DEB+NE	39°C	115	49,6	27,8	47,8	7,0	15,7	-	86,2
DEB+NE+V		-	-	keine Mitosen					

Zur Absicherung der Ergebnisse aus Tabelle 36 wurde ein Wiederholungsexperiment unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt (Tab.37). Hierbei wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37°C mit NE oder NE+V inkubiert. Auch in diesem Versuch wurde die Anzahl der Chromatidbrüche durch die NE-Behandlung mehr als verdoppelt.

TABELLE 37:

EINFLUSS EINER GLEICHZEITIGEN G1-BEHANDLUNG MIT DEB, NE UND VIRUS AUF DIE RATE STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN.

Die Zellen wurden zur 20. Kulturstunde mit DEB behandelt. Nach 15 Minuten Inkubation in Eis wurden NE (4-8 Ein.) und Virus (125 I.E.) zugegeben.

Konzentration DEB $1,3 \times 10^{-5} M$; Behandlungsdauer 52 h.

Behandlungsdauer NE+V 30 Min. bei 37°C,

Kulturdauer 72 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung.

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			Al	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
DEB	200	10,5	16,0	11,5	1,0	1,0	-	14,5
DEB+V	200	13,0	10,0	9,5	2,0	2,0	-	15,5
DEB+NE	200	22,0	11,5	23,5	4,5	4,5	-	37,0
DEB+NE+V	200	35,0	14,0	31,5	7,0	8,0	-	54,5

In einem weiteren Experiment wurden die Zellen zur 20. Kulturstunde mit folgenden DEB Konzentrationen behandelt: $0,65 \times 10^{-5} \text{M}$, $1,3 \times 10^{-5} \text{M}$ und $2,6 \times 10^{-5} \text{M}$. Nach 15 Minuten wurde das Pellet mit NE behandelt (Tab.38). Bei der niedrigsten DEB Konzentration konnte keine Beeinflussung der Aberrationsrate durch die NE-Behandlung nachgewiesen werden. Behandlung mit $1,3 \times 10^{-5} \text{M}$ und $2,6 \times 10^{-5} \text{M}$ DEB bestätigen prinzipiell die Ergebnisse aus Tabelle 36 und 37.

TABELLE 38:

EINFLUSS EINER GLEICHZEITIGEN BEHANDLUNG MIT DEB UND NE AUF DIE RATE STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN.

Die Zellen wurden zur 20. Kulturstunde mit DEB behandelt. Nach 15 Min. Inkubation in Eis wurden 4-8 Einheiten NE zugegeben.

Behandlungsdauer DEB 52 Stunden; Behandlungsdauer NE 30 Minuten bei 37°C
Kulturdauer 72 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung.

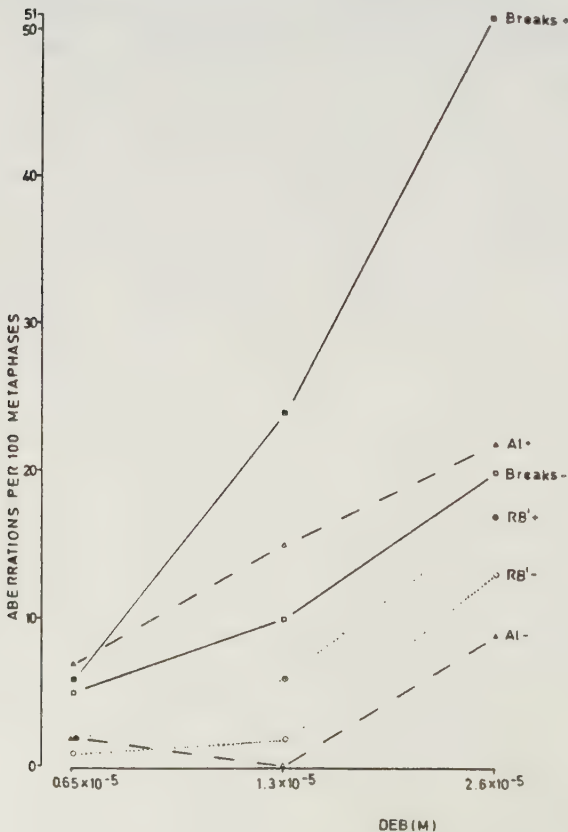
Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
$0,65 \times 10^{-5} \text{M}$	100	7,0	2,0	5,0	-	1,0	1,0	9,0
$0,65 \times 10^{-5} \text{M} + \text{NE}$	100	8,0	7,0	6,0	-	2,0	-	10,0
$1,30 \times 10^{-5} \text{M}$	100	12,0	-	7,0	3,0	2,0	-	12,0
$1,30 \times 10^{-5} \text{M} + \text{NE}$	100	25,0	15,0	19,0	5,0	6,0	2,0	40,0
$2,60 \times 10^{-5} \text{M}$	100	24,0	9,0	14,0	6,0	13,0	-	46,0
$2,60 \times 10^{-5} \text{M} + \text{NE}$	100	47,0	22,0	41,0	10,0	17,0	-	85,0
K0	100	0,0	-	-	-	-	-	0,0

ABBILDUNG 5:

Chromosomale Aberrationen in menschlichen Lymphozyten nach DEB und NE Behandlung in der G1-Phase des Zellzyklus.

Die Abbildung zeigt die Daten aus Tabelle 38.

- A1 - : Achromatische Läsionen in DEB behandelten Kulturen
A1 + : Achromatische Läsionen in DEB und NE behandelten Kulturen
Breaks - : Chromatid-und Isochromatid/Chromosomenbrüche in DEB behandelten Kulturen
Breaks + : Chromatid-und Isochromatid/Chromosomenbrüche in DEB und NE behandelten Kulturen
RB'- : Chromatidentranslokationen in DEB behandelten Kulturen
RB' + : Chromatidentranslokationen in DEB und NE behandelten Kulturen



In Tabelle 39 wurden die vergleichbaren Daten der drei beschriebenen G1-Behandlungen mit DEB zusammengefaßt. Die Anzahl aberranter Mitosen stimmt in allen DEB behandelten Kulturen überein (10,5% bis 12,0%). In DEB+NE behandelten Kulturen dagegen schwankt die Aberrationsrate stark (22,0% bis 38%). Aus den Einzeldaten ist ersichtlich, daß in jedem Versuch eine NE-Wirkung nachgewiesen werden konnte. Die Enzymaktivität unterliegt allerdings starken Schwankungen, wovon sowohl Chromatidbrüche als auch Chromatidentranslokationen betroffen sind.

TABELLE 39:

EINFLUSS EINER GLEICHZEITIGEN G1-BEHANDLUNG MIT DEB UND NE AUF DIE RATE STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKZYTENKULTUREN.

Die Zellen wurden zur 20. Kulturstunde mit DEB behandelt. Nach 15 Min. Inkubation in Eis wurden 4-8 Einheiten NE zugegeben.

Behandlungsdauer DEB 52 Stunden; Behandlungsdauer NE 30 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 72 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung.

Konzentration DEB $1,3 \times 10^{-5} M$

Behandlung	Versuch	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen				Bruchrate
				A1	B'	B''	RB'	
DEB	A	200	11,0	8,5	7,5	1,5	3,5	16,0
	B	200	10,5	16,0	11,5	1,0	1,0	14,5
	C	100	12,0	-	7,0	3,0	2,0	14,0
	A+B+C	500	11,0	9,8	9,0	1,6	2,2	15,0
DEB+NE	A	192	38,0	17,7	38,5	3,1	13,0	67,6
	B	200	22,0	11,5	23,5	4,5	4,5	37,0
	C	100	25,0	15,0	19,5	5,0	6,0	36,5
	A+B+C	492	28,9	14,9	28,5	4,1	8,1	48,8

Ergänzend zu den oben beschriebenen DEB Dauerbehandlungen mit gleichzeitiger NE-Behandlung wurde eine 45 minütige DEB Pulsbehandlung zur 20. Kulturstunde mit darauffolgender NE-Nachbehandlung durchgeführt (Tab.40). Bei einer DEB Konzentration von $2,6 \times 10^{-5} \text{ M}$ wurden 17% aberrante Mitosen, in NE-nachbehandelten Kulturen 36% aberrante Mitosen gefunden. Die Anzahl der Chromatidbrüche steigt durch die NE-Zugabe auf das Vierfache. Mit dem gleichen Versuchsansatz sollte außerdem untersucht werden, ob DEB induzierte Läsionen lediglich unmittelbar nach der Behandlung oder auch noch längere Zeit danach durch NE beeinflusst werden. Die Zeit vom Ende der Mutagenbehandlung bis zur NE-Zugabe wurde als Erholungszeit definiert. Vor der NE-Zugabe wurden die Kulturen zentrifugiert und das Medium abgehoben. Die NE-Nachbehandlung erfolgte entweder unmittelbar danach für 30 Minuten bei 37° C (0-30 Min.), oder nach Erholungszeiten von 30 Minuten (30-60 Min.), 60 Minuten (60-90 Min.), 120 Minuten (120-150 Min.). Die Erholungszeit hat auf DEB behandelte Kulturen keinen Einfluß, die Bruchrate liegt zwischen 23,0 und 28,0. NE-Nachbehandlung unmittelbar nach der DEB Behandlung oder nach einer Erholungszeit von 120 Minuten hatte den stärksten Einfluß auf die Aberrationsrate, die Bruchrate steigt bis auf 74,0 bzw. 75,0. NE-Zugabe 60 oder 90 Minuten nach der DEB Behandlung führt auch vermehrt zu Chromatidenaberrationen, die Steigerung ist aber deutlich geringer, die Bruchrate liegt bei 37,0 bzw. 43,0.

TABELLE 40:

EINFLUSS EINER G1-NACHBEHANDLUNG MIT NE AUF DIE RATE DEB INDUZIERTER STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN.
Die Zellen wurden zur 20. Kulturstunde für 45 Minuten mit DEB behandelt (Pulsbehandlung). Die NE-Zugabe (4-8 Einh.) erfolgte sofort, nach 30, 60 und 120 Minuten.
Behandlungsdauer NE 30 Minuten bei 37° C
Konzentration DEB $2,6 \times 10^{-5} \text{ M}$
Kulturdauer 72 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung

Behandlung	NE-Behandlung (min.)	Anzahl ausgewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in			100 Mitosen		Bruch-
				A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
DEB		100	17,0	7,0	11,0	1,0	8,0	-	28,0
DEB+NE	0-30	100	36,0	20,0	44,0	4,0	13,0	-	74,0
DEB		100	16,0	5,0	11,0	1,0	6,0	-	24,0
DEB+NE	30-60	100	24,0	8,0	25,0	4,0	4,0	-	37,0
DEB		100	21,0	8,0	18,0	-	4,0	-	26,0
DEB+NE	120-150	100	38,0	33,0	37,0	2,0	18,0	-	75,0
K.O	-	100	1,0	-	1,0	-	-	-	1,0

1.6.2. G2-Behandlung mit DEB und NE

Tabelle 40 zeigt die Ergebnisse einer 45 minütigen DEB Behandlung zur 45. Kulturstunde. Sofort anschließend wurden die Zellen mit NE nachbehandelt. Alle getesteten DEB Konzentrationen erhöhen die Aberrationsrate nur geringfügig über Kontrollniveau. Die NE-Nachbehandlung bleibt ebenfalls ohne Einfluß auf die Aberrationsrate.

TABELLE 41:

EINFLUSS EINER G2-NACHBEHANDLUNG MIT NE AUF DIE RATE DER INDUZIERTER STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN.

Die Zellen wurden zur 45. Kulturstunde für 45 Minuten mit DEB bei 37° C behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden 4-8 Einheiten NE zugegeben.

Behandlungsdauer NE 30 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 50 h einschließlich 4 h Colcemidbehandlung.

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
$0,7 \times 10^{-5} M$	100	1,0	5,0	1,0	-	-	-	1,0
$0,7 \times 10^{-5} M + NE$	100	0,0	2,0	-	-	-	-	0,0
$1,3 \times 10^{-5} M$	100	3,0	1,0	2,0	1,0	-	-	3,0
$1,3 \times 10^{-5} M + NE$	100	0,0	8,0	-	-	-	-	0,0
$6,5 \times 10^{-5} M$	100	1,0	5,0	1,0	-	-	-	1,0
$6,5 \times 10^{-5} M$	100	5,0	10,0	4,0	-	-	1,0	6,0
$1,3 \times 10^{-4} M$	100	2,0	5,0	2,0	-	-	-	2,0
$1,3 \times 10^{-4} M + NE$	100	2,0	7,0	2,0	-	-	-	2,0
K0	100	0,0	8,0	-	-	-	-	0,0

1.7. Trenimon (Tre)

1.7.1. G1-Behandlung mit Trenimon und NE

Die Zellen wurden zur 20. Kulturstunde mit verschiedenen Konzentrationen von Trenimon im Pellet behandelt. 15 Minuten später erfolgte die NE-Zugabe. Das Trenimon blieb bis zur Fixierung in den Kulturen. Für jede der getesteten Konzentrationen wurden drei unterschiedliche NE-Behandlungen durchgeführt. Es sollte geklärt werden, ob die NE-Aktivität durch Temperatur und Behandlungsdauer beeinflusst werden kann. Behandlung mit 5×10^{-9} M Trenimon (Tab. 42a) induziert keine erhöhten Aberrationsraten, die NE-Behandlung ist ebenfalls ohne Einfluß. 1×10^{-8} M Trenimon (Tab. 42b) führt zu maximal 3% aberranten Mitosen. Die NE-Behandlung steigert diese Rate bis auf 9,5%. Besonders die Häufigkeiten der Chromatidbrüche nehmen zu, aber auch die der Chromosomenaberrationen (B'', Dic/Ring) nehmen nach der NE-Behandlung zu. 5×10^{-8} M Trenimon (Tab. 42c) induziert ähnliche Aberrationsraten wie 1×10^{-8} M Trenimon, auch die NE-Behandlung ist ähnlich wirksam. Die unterschiedlichen Bedingungen während der NE-Behandlung haben keinen Einfluß auf die NE-Wirkung.

TABELLE 42 a:

EINFLUSS EINER GLEICHZEITIGEN G1-BEHANDLUNG MIT TRENIMON UND NE AUF DIE RATE STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN.

Die Zellen wurden zur 20. Kulturstunde mit Trenimon behandelt. Nach 15 Minuten Inkubation in Eis erfolgte die NE-Zugabe.

Konzentration Trenimon 5×10^{-9} M; Behandlungsdauer 30 h

Kulturdauer 50 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung.

Behandlung	Behandlungs- dauer NE	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen				Bruch- rate
				A1	B'	B''	Dic+Ring	
Tre	15 Min. Eis,	100	1,0	-	1,0	-	-	1,0
Tre+NE(2-4E.)	15 Min. 37°C	100	1,0	2,0	-	1,0	-	1,0
Tre+NE(4-8E.)		100	2,0	1,0	2,0	-	-	2,0
Tre	30 Min. bei	100	0,0	-	-	-	-	0,0
Tre+NE(2-4E.)	37°C	100	0,0	3,0	-	-	-	0,0
Tre+NE(4-8E.)		100	2,0	1,0	1,0	1,0	-	2,0
Tre	30 Min. bei	100	0,0	2,0	-	-	-	0,0
Tre+NE(2-4E.)	39°C	100	1,0	-	-	-	-	1,0
Tre+NE(4-8E.)		100	2,0	3,0	1,0	1,0	-	2,0

TABELLE 42 b:

Konzentration Trenimon $1 \times 10^{-8} M$

Behandlung	Behandlungs- dauer NE	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen			Dic+Ring	Bruch- rate
				A1	B'	B''		
Tre	15Min.Eis.	400	1,5	2,8	0,8	0,5	0,3	1,9
Tre+NE(2-4E.)	15Min.37°C	333	3,9	5,7	2,1	1,2	0,6	4,5
Tre+NE(4-8E.)		257	7,8	6,2	5,8	2,0	0,4	8,6
Tre	30 Min.bei	200	3,0	4,5	3,0	0,5	-	3,5
Tre+NE(2-4E.)	37°C	200	8,0	6,5	6,0	2,0	1,0	10,0
Tre+NE(4-8E.)		-		keine Mitosen				
Tre	30 Min.bei	200	2,5	3,0	2,5	-	-	2,5
Tre+NE(4-8E.)	39°C	200	5,0	9,5	4,5	0,5	-	5,0
Tre+NE(4-8E.)		200	7,0	7,5	5,5	1,0	0,5	7,5

TABELLE 42 c:

Konzentration Trenimon $5 \times 10^{-8} M$

Behandlung	Behandlungs- dauer NE	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen			Dic+Ring	Bruch- rate
				A1	B'	B''		
Tre	15Min.Eis.	200	4,0	3,5	2,5	0,5	1,0	5,0
Tre+NE(2-4E.)	15Min. 37°C	157	4,5	5,7	3,8	-	1,2	5,0
Tre+NE(4-8E.)		170	8,2	8,8	7,1	1,8	-	7,1
Tre	30 Min.bei	200	1,5	5,0	1,5	0,5	-	2,0
Tre+NE(2-4E.)	37°C	200	5,0	9,0	3,5	1,0	0,5	5,5
Tre+NE(4-8E.)		106	8,5	8,5	7,5	2,8	-	10,3
Tre	30 Min.bei	200	1,5	5,0	1,5	-	-	1,5
Tre+NE(2-4E.)	39°C	200	3,0	8,5	1,5	1,0	0,5	3,5
Tre+NE(4-8E.)		138	6,5	10,1	6,5	0,7	-	7,2

Im Hinblick auf die NE-Wirkung sind Behandlungstemperatur und -dauer ohne Einfluß auf die Aberrationsrate, deshalb wurden alle Behandlungsarten mit der gleichen Trenimonkonzentration (s. Tab.42a,b,c) zusammengefaßt und in Tabelle 43 dargestellt. Es zeigt sich eine deutliche steigernde Wirkung der NE-Behandlung auf die Aberrationsraten.

TABELLE 43:

EINFLUSS EINER GLEICHZEITIGEN G1-BEHANDLUNG MIT TRENIMON UND NE AUF DIE RATE STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN.

Die Zellen wurden zur 20. Kulturstunde mit Trenimon behandelt. Nach 15 Minuten Inkubation in Eis erfolgt die NE-Zugabe (4-8 Einh.).

Behandlungsdauer Trenimon 30 h

Kulturdauer 50 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung.

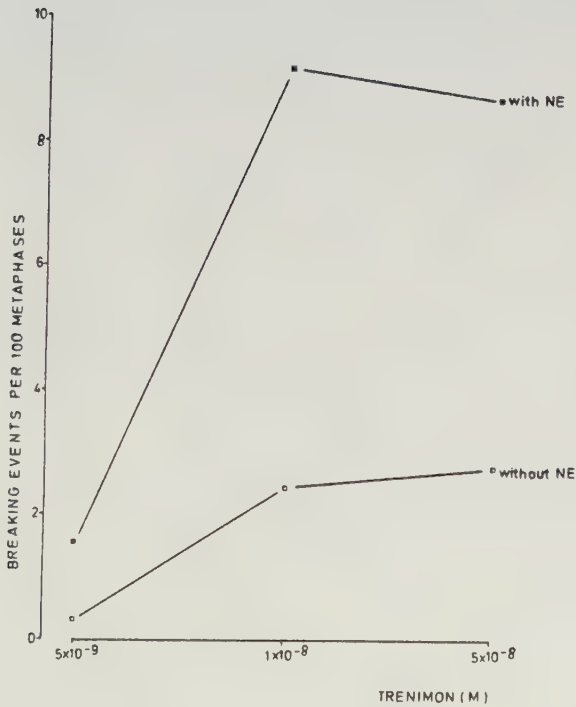
Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
$5 \times 10^{-9} M$	300	0,3	0,7	0,3	-	-	-	0,3
$5 \times 10^{-9} M + NE$	300	2,0	1,7	1,3	0,2	-	-	1,6
$1 \times 10^{-8} M$	800	2,1	3,3	1,8	0,4	-	1,6	2,5
$1 \times 10^{-8} M + NE$	457	7,5	6,8	5,7	2,7	-	0,5	9,2
$5 \times 10^{-8} M$	600	2,3	4,5	1,8	0,3	-	0,3	2,8
$5 \times 10^{-8} M + NE$	414	7,7	9,2	7,0	1,7	-	-	8,7

ABBILDUNG 6:

Bruchrate in menschlichen Lymphozyten nach Trenimon und NE-Behandlung in der G1-Phase des Zellzyklus.

Die Abbildung zeigt die Daten aus Tabelle 43.

- : Bruchrate in Trenimon behandelten Kulturen
■ : Bruchrate in Trenimon und NE behandelten Kulturen



1.7.2. G2-Behandlung mit Trenimon und NE

Die Trenimonbehandlung wurde zur 44. Kulturstunde als 45 minütige Pulsbehandlung durchgeführt (Tab.44). Anschließend wurden die Zellen mit NE nachbehandelt, zwischen dem Behandlungsbeginn mit Trenimon und der Fixierung lagen 6 Stunden. Trenimonbehandlung allein induzierte hohe Aberrationsraten (bis 36% aberrante Mitosen), durch die NE-Nachbehandlung wurde die Aberrationsrate mindestens verdoppelt, teilweise verdreifacht.

TABELLE 44:

EINFLUSS EINER G2-NACHBEHANDLUNG MIT NE AUF TRENIMON INDUZIERT E STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN.

Die Zellen wurden zur 44. Kulturstunde für 45 Minuten mit Trenimon behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden 4-8 Einheiten NE zugegeben.

Behandlungsdauer NE 30 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 50 h einschließlich 4 h Colcemidbehandlung.

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			Al	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
$5 \times 10^{-8} M$	100	0,0	3,0	-	-	-	-	0,0
$5 \times 10^{-8} M+NE$	100	2,0	6,0	2,0	-	-	-	2,0
$1 \times 10^{-7} M$	100	2,0	4,0	2,0	-	-	-	2,0
$1 \times 10^{-7} M+NE$	100	12,0	18,0	11,0	-	-	1,0	13,0
$5 \times 10^{-7} M$	100	14,0	27,0	14,0	-	-	-	14,0
$5 \times 10^{-7} M+NE$	100	30,0	42,0	3,0	3,0	1,0	1,0	49,0
$1 \times 10^{-6} M$	100	36,0	17,0	47,0	-	-	-	47,0
$1 \times 10^{-6} M+NE$	100	52,0	52,0	124,0	4,0	-	-	128,0
K0	100	3,0	-	2,0	1,0	-	.	3,0

Tabelle 45 zeigt die Ergebnisse einer 45 minütigen Pulsbehandlung mit Trenimon zur 45. Kulturstunde. Zwischen dem Behandlungsbeginn und der Fixierung lagen 5 Stunden. Trenimonbehandlung allein induzierte maximal 10% aberrante Mitosen, die NE-Nachbehandlung führte nur noch in der höchsten Trenimkonzentration zu einer knappen Verdopplung (17% aberrante Mitosen) der Aberrationsrate.

TABELLE 45:

EINFLUSS EINER G2-NACHBEHANDLUNG MIT NE AUF TRENIMON INDUZIERTER STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN.

Die Zellen wurden zur 45. Kulturstunde für 45 Minuten mit Trenimon behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden 4-8 Einheiten NE zugegeben.

Behandlungsdauer NE 30 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 50 h einschließlich 3 h Colcemidbehandlung.

Behandlung	Anzahl ausgewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
$5 \times 10^{-8} M$	100	0,0	4,0	-	-	-	-	0,0
$5 \times 10^{-8} M + NE$	100	1,0	3,0	1,0	-	-	-	1,0
$1 \times 10^{-7} M$	100	5,0	3,0	5,0	-	-	-	5,0
$1 \times 10^{-7} M + NE$	100	5,0	16,0	5,0	-	-	-	5,0
$5 \times 10^{-7} M$	100	10,0	8,0	9,0	1,0	-	1,0	12,0
$5 \times 10^{-7} M + NE$	100	17,0	18,0	18,0	-	-	1,0	20,0
$1 \times 10^{-6} M$	-	-	Keine Mitosen					-
$1 \times 10^{-6} M + NE$	-	-	Keine Mitosen					-
KD	100	0,0	2,0	-	-	-	-	0,0

Tabelle 46 zeigt die Ergebnisse einer 30 minütigen Pulsbehandlung mit Trenimon zur 46. Kulturstunde. Zwischen Behandlungsbeginn und Fixierung lagen 3,5 Stunden. Trenimon allein induzierte 6% aberrante Mitosen, Nachbehandlung mit NE hatte ebenfalls 6% aberrante Mitosen zur Folge.

TABELLE 46:

EINFLUSS EINER G2-NACHBEHANDLUNG MIT NE AUF TRENIMON INDUZIERTER STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN.

Die Zellen wurden zur 46. Kulturstunde für 30 Minuten mit Trenimon behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden 4-8 Einheiten NE zugegeben.

Behandlungsdauer NE 30 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 50 h einschließlich 2 h Colcemidbehandlung.

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
$1 \times 10^{-7} M$	100	4,0	15,0	4,0	-	-	-	4,0
$1 \times 10^{-7} M + NE$	100	2,0	16,0	-	-	2,0	-	4,0
$5 \times 10^{-7} M$	100	6,0	28,0	6,0	-	-	-	6,0
$5 \times 10^{-7} M + NE$	100	6,0	20,0	6,0	-	-	-	6,0

1.8. Acetaldehyd

1.8.1. G1-Behandlung mit Acetaldehyd und NE

Die Lymphozyten wurden zur 20. Kulturstunde im Pellet mit Acetaldehyd behandelt, nach 15 Minuten wurde NE zugegeben. Die Dauerbehandlung mit Acetaldehyd erfolgte mit folgenden Konzentrationen: $2 \times 10^{-5} \text{M}$ und $3 \times 10^{-5} \text{M}$. In Tabelle 47 sind die Ergebnisse von zwei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten aufgeführt. Sowohl durch die Behandlung mit Acetaldehyd allein, als auch durch die Behandlung mit Acetaldehyd und NE konnten nicht vermehrt strukturelle Aberrationen induziert werden.

TABELLE 47:

EINFLUSS EINER GLEICHZEITIGEN G1-BEHANDLUNG MIT ACETALDEHYD UND NE AUF DIE RATE STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN.

Die Zellen wurden zur 20. Kulturstunde mit Acetaldehyd behandelt (Dauerbehandlung).

Nach 15 Minuten wurden 4-8 Einheiten NE zugegeben.

Behandlungsdauer NE 30 Minuten bei 37°C

Kulturdauer 50 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung.

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
$2 \times 10^{-5} \text{M}$	200	2,0	1,0	1,5	-	-	0,5	2,5
$2 \times 10^{-5} \text{M} + \text{NE}$	200	0,0	2,0	-	-	-	-	0,0
$3 \times 10^{-5} \text{M}$	200	1,0	6,5	0,5	0,5	-	-	1,0
$3 \times 10^{-5} \text{M} + \text{NE}$	176	2,8	2,3	1,7	1,1	-	-	2,8
K0	200	0,5	2,5	-	0,5	-	-	0,5

1.9. Formaldehyd

1.9.1. G1-Behandlung mit Formaldehyd und NE

Die Lymphozyten wurden zur 20. Kulturstunde im Pellet mit Formaldehyd behandelt, nach 15 Minuten wurde NE zugegeben. Die Dauerbehandlung mit Formaldehyd wurde mit folgenden Konzentrationen durchgeführt: $5 \times 10^{-6} \text{M}$ und $1 \times 10^{-5} \text{M}$. In der Tabelle 48 sind die Ergebnisse von zwei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen aufgeführt. Sowohl durch die Behandlung mit Formaldehyd allein, als auch durch die Behandlung mit Formaldehyd und NE konnten nicht vermehrt strukturelle Aberrationen induziert werden.

TABELLE 48:

EINFLUSS EINER GLEICHZEITIGEN G1-BEHANDLUNG MIT FORMALDEHYD UND NE AUF DIE RATE STRUKTURELLER ABERRATIONEN IN LEUKOZYTENKULTUREN.

Die Zellen wurden zur 20. Kulturstunde mit Formaldehyd behandelt (Dauerbehandlung).

Anschließend wurden 4-8 Einheiten NE zugegeben.

Behandlungsdauer NE 30 Minuten bei 37°C

Kulturdauer 50 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			Al	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
$5 \times 10^{-6} \text{M}$	200	0,5	3,0	0,5	-	-	-	0,5
$5 \times 10^{-6} \text{M} + \text{NE}$	200	0,0	2,5	-	-	-	-	0,0
$1 \times 10^{-5} \text{M}$	200	2,0	3,5	2,0	-	-	-	2,0
$1 \times 10^{-5} \text{M} + \text{NE}$	200	2,5	3,5	2,0	0,5	-	-	2,5
K0	200	0,0	2,5	-	-	-	-	0,0

2. Lymphozytenkulturen, Auswertung auf SCE

2.1. G1-Behandlung von Kontrollkulturen mit NE

Im ersten Teil der Arbeit sind Lymphozyten nach einer Mutagen- und NE-Behandlung auf strukturelle Aberrationen in ersten Mitosen untersucht worden. Durch Nachbehandlung mit NE konnte die Rate mutageninduzierter Aberrationen häufig deutlich gesteigert werden.

Im zweiten Teil wurde untersucht, ob die NE-Behandlung einen Einfluß auf die SCE-Rate hat. Das Zellsediment wurde zur 20. Kulturstunde mit NE und BUdR behandelt. Nach 30 Minuten wurde das Kulturmedium wieder zugesetzt. In zweiten Mitosen nach Kulturansatz wurden SCE ausgewertet. Zwei verschiedene Blutproben (Tab. 49a, b) wurden mit verschiedenen NE-Konzentrationen bis zur cytotoxischen Grenze behandelt. Die SCE-Rate lag immer im Kontrollbereich.

TABELLE 49 a:

EINFLUSS EINER NE BEHANDLUNG AUF DIE SCE-RATE IN BUdR-MARKIERTEN LEUKOZYTENKULTUREN.

Die Zellen wurden zur 20. Kulturstunde mit NE und BUdR behandelt.

Behandlungsdauer NE 30 Minuten bei 37°C

Kulturdauer 72 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung

SD: Standardabweichung

SE: Standardfehler

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	SCE pro Mitose	SD	SE
K0	25	5,80	1,9	0,39
K0+2-4 Einh.NE	25	5,60	2,3	0,46
K0+4-8 Einh.NE	25	4,64	2,7	0,55
K0+6-12Einh.NE	25	4,96	2,3	0,47
K0+8-16Einh.NE	10	6,10	1,6	0,50

TABELLE 49 b:

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	SCE pro Mitose	SD	SE
K0	25	5,40	2,5	0,49
K0+2-4 Einh.NE	25	5,28	2,4	0,49
K0+4-8 Einh.NE	25	5,44	2,2	0,43
K0+6-12Einh.NE	25	5,80	4,0	0,79
K0+8-16Einh.NE	-	-	-	-

2.2. G1-Behandlung mit DEB und NE

Die Lymphozyten wurden zur 19. Kulturstunde im Pellet mit verschiedenen Dosen DEB behandelt ($0,2 \times 10^{-5} \text{M}$ bis $1,3 \times 10^{-5} \text{M}$). Die NE-Zugabe erfolgte unmittelbar nach der 45 minütigen DEB Pulsbehandlung auf das Zellsediment. Eine Steigerung der SCE-Rate durch die NE-Zugabe konnte nicht erreicht werden (Tab.50).

Parallel zu der SCE-Auswertung konnten bei der DEB Konzentration von $1,3 \times 10^{-5} \text{M}$ auch strukturelle Aberrationen ausgewertet werden (s.Tab.38). Die Anzahl der Chromatidenaberrationen war nach der NE-Behandlung verdoppelt, die SCE-Rate dagegen blieb unbeeinflusst. Bei den übrigen 72-Stunden Kulturen, die BUdR enthielten (Tab.38), lag die SCE-Rate für eine sinnvolle Auswertung zu hoch.

TABELLE 50:

EINFLUSS EINER G1-NACHBEHANDLUNG MIT NE AUF DIE DEB
INDUZIERTER SCE-RATE IN BUdR-MARKIERTEN LEUKOZYTENKULTUREN.

Die Zellen wurden zur 19. Kulturstunde für 45 Minuten mit
DEB behandelt (Pulsbehandlung) und BUdR (10^{-5}M)

Behandlungsdauer NE 30 Minuten bei 37°C

Kulturdauer 75 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung

SD: Standardabweichung

SE: Standardfehler

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	SCE pro Mitose	SD	SE
$0,2 \times 10^{-5} \text{M}$	25	10,4	2,9	0,58
$0,2 \times 10^{-5} \text{M} + \text{NE}$	25	13,2	4,7	0,94
$0,5 \times 10^{-5} \text{M}$	25	13,6	3,2	0,64
$0,5 \times 10^{-5} \text{M} + \text{NE}$	25	15,7	3,4	0,68
$0,9 \times 10^{-5} \text{M}$	25	26,7	9,1	1,82
$0,9 \times 10^{-5} \text{M} + \text{NE}$	25	21,4	6,5	1,31
$1,3 \times 10^{-5} \text{M}$	20	40,7	6,5	1,45
$1,3 \times 10^{-5} \text{M} + \text{NE}$	20	21,2	6,3	1,41
KO	25	4,5	1,9	0,37

In einem weiteren Experiment wurden die Lymphozyten zur 20. Kulturstunde im Pellet mit DEB behandelt, nach 15 Minuten wurde NE zugegeben (Tab.51). DEB blieb bis zur Fixierung in den Kulturen. DEB Behandlung allein ($1,3 \times 10^{-5} \text{M}$) induzierte 84,5 bzw. 90,3 SCE pro Mitose. Nachbehandlung mit NE ergab 90,2 (Nachbehandlung für 30 Min. bei 37°C) und 98,5 (Nachbehandlung für 15 Min. in Eis und 15 Min. bei 37°C). SCE pro Mitose. $0,4 \times 10^{-5} \text{M}$ DEB induzierte 29,9 SCE pro Mitose, in den NE-behandelten Kulturen wurden 27,1 SCE pro Mitose gefunden.

TABELLE 51:

EINFLUSS EINER GLEICHZEITIGEN G1-BEHANDLUNG MIT DEB UND NE AUF DIE SCE-RATE IN BUDR-BEHANDELTEN LEUKOZYTENKULTUREN. Die Zellen wurden zur 20. Kulturstunde im Pellet mit DEB behandelt. Nach 15 Minuten in Eis wurden NE (4-8 Eiph.) und BUDR zugegeben.

Behandlungsdauer DEB 52 h

Kulturdauer 72 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung

SD: Standardabweichung

SE: Standardfehler

Behandlung	Behandlungsdauer NE	Anzahl ausgewerteter Mitosen	SCE pro Mitose	SD	SE
$0,4 \times 10^{-5} \text{M}$	30 Min. 37°C	25	29,9	8,60	1,72
$0,4 \times 10^{-5} \text{M} + \text{NE}$		25	27,1	9,75	1,95
$1,3 \times 10^{-5} \text{M}$	30 Min. 37°C	25	84,5	11,0	2,20
$1,3 \times 10^{-5} \text{M} + \text{NE}$		25	90,2	8,1	1,62
$1,3 \times 10^{-5} \text{M}$	15 Min. Eis, 15 Min. 37°C	25	90,3	14,2	2,83
$1,3 \times 10^{-5} \text{M} + \text{NE}$		25	98,5	13,3	2,65
KO	-	25	5,1	2,5	0,5

2.3. G1-Behandlung mit Trenimon und NE

Die Lymphozyten wurden zur 19. Kulturstunde mit verschiedenen Dosen Trenimon behandelt ($5 \times 10^{-9} \text{ M}$ bis $1 \times 10^{-7} \text{ M}$). Die NE-Zugabe erfolgte unmittelbar nach der 60 minütigen Trenimonbehandlung, auf das Pellet (Tab.52). Durch Trenimon ($1 \times 10^{-7} \text{ M}$) wurden 31,3 SCE pro Mitose induziert, Nachbehandlung mit NE hatte nur einen geringfügigen Einfluß auf die SCE-Rate. Eine gleichzeitige Auswertung auf strukturelle Aberrationen wurde nicht durchgeführt.

TABELLE 52:

EINFLUSS EINER G1-NACHBEHANDLUNG MIT NE AUF DIE
TRENIMON INDUZIERTES SCE-RATE IN BUDR-BEHANDELTEN LEUKOZY-
TENKULTUREN.

Die Zellen wurden zur 19. Kulturstunde für 60 Minuten mit Trenimon behandelt (Pulsbehandlung bei 37° C). Anschließend wurden NE (4-8 Einheiten) und BUDR zugegeben.

Behandlungsdauer NE 30 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 75 Stunden einschließlich 5 h Colcemidbehandlung

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	SCE pro Mitose	SD	SE
$5 \times 10^{-9} \text{ M}$	25	6,16	3,5	0,69
$5 \times 10^{-9} \text{ M} + \text{NE}$	25	7,48	3,2	0,64
$1 \times 10^{-8} \text{ M}$	25	7,64	3,5	0,70
$1 \times 10^{-8} \text{ M} + \text{NE}$	25	9,52	3,5	0,70
$5 \times 10^{-8} \text{ M}$	25	15,44	6,0	1,19
$5 \times 10^{-8} \text{ M} + \text{NE}$	25	16,16	5,0	0,99
$1 \times 10^{-7} \text{ M}$	18	31,28	11,6	2,72
$1 \times 10^{-7} \text{ M} + \text{NE}$	25	24,32	11,2	2,23
K0	25	4,48	1,85	0,37

2.4. Mitosefolgen

Es wurden die Mitosefolgen für Kontrollkulturen und für in G1 mit NE behandelte Kulturen bestimmt. Steigende NE-Konzentration bewirkte eine Verlangsamung des Zellzyklus. In Kontrollen wurden mit zwei verschiedenen Blutproben (Tab.53a,b) 42% bzw. 57% erste Mitosen gefunden. Nach Behandlung mit 8-16 Einheiten NE lag die Rate erster Mitosen bei 89% bzw. 96%. Für den Proliferationsindex wurden erste Mitosen mit dem Faktor eins, zweite Mitosen mit dem Faktor zwei und dritte Mitosen mit dem Faktor drei multipliziert. Die drei Zahlen wurden addiert und als Proliferationsindex angegeben. Somit kann der Index maximal 300 (nur dritte Mitosen) und minimal 100 (nur erste Mitosen) betragen. Der Index hat den Vorteil, Zellzyklusverzögerungen an Hand einer Zahl abzuschätzen.

Der Proliferationsindex sinkt nach der NE-Behandlung stark ab. In den beiden Kontrollkulturen lag er bei 172 bzw. 150. Nach Behandlung mit der höchsten NE-Konzentration betrug er nur noch 111 bzw. 104.

TABELLE 53 a:

MITOSEFOLGEN UND PROLIFERATIONSINDEX NACH BEHANDLUNG MIT NE IN BUDR-BEHANDELTEN LEUKOZYTENKULTUREN.

Die Behandlungsbedingungen sind aus Tabelle 49 a, b ersichtlich.

Behandlung	1.Mitosen (%)	2.Mitosen (%)	3. Mitosen (%)	Proliferationsindex
K0	42	44	14	172
K0+2- 4Einh.NE	40	52	8	168
K0+4- 8Einh.NE	50	50	0	150
K0+6-12Einh.NE	70	29	1	131
K0+8-16Einh.NE	89	11	0	111

TABELLE 53 b:

Behandlung	1.Mitosen (%)	2.Mitosen (%)	3.Mitosen (%)	Prolife- rations- index
K0	57	36	7	150
K0+2- 4Einh.NE	65	33	2	137
K0+4- 8Einh.NE	63	34	3	136
K0+6-12Einh.NE	86	14	0	114
K0+8-16Einh.NE	96	4	0	104

In Tabelle 54 sind die Mitosefolgen für eine G1-Behandlung mit DEB und Nachbehandlung mit NE aufgeführt. Nach Behandlung mit $0,2 \times 10^{-5}$ M DEB wurden 37% erste Mitosen gefunden, nach Behandlung mit $1,3 \times 10^{-5}$ M DEB 71%. Somit konnte nachgewiesen werden, daß DEB in den getesteten Konzentrationen den Zellzyklus verzögert. Vergleicht man DEB behandelte mit DEB+NE behandelten Kulturen, wird eine zusätzliche Verzögerung des Zellzyklus durch NE induziert. Dritte Mitosen wurden nicht mehr gefunden und die Anzahl erster Mitosen stieg um durchschnittlich 20% an.

TABELLE 54:

MITOSEFOLGEN UND PROLIFERATIONSINDEX NACH BEHANDLUNG MIT DEB UND NE IN BUDR-BEHANDELTEN LEUKOZYTENKULTUREN.

Die Behandlungsbedingungen für DEB und NE sind aus Tabelle 46 ersichtlich.

Behandlung	1.Mitosen (%)	2.Mitosen (%)	3.Mitosen (%)	Proliferations-index
$0,2 \times 10^{-5}$ M	37	47	16	179
$0,2 \times 10^{-5}$ M+NE	64	36	0	136
$0,5 \times 10^{-5}$ M	59	40	1	142
$0,5 \times 10^{-5}$ M+NE	73	27	0	127
$0,9 \times 10^{-5}$ M	58	40	2	144
$0,9 \times 10^{-5}$ M+NE	80	20	0	120
$1,3 \times 10^{-5}$ M	71	26	3	132
$1,3 \times 10^{-5}$ M+NE	92	8	0	108
K0	70	26	4	134

2.5. Mitoseindices (MI)

Die Mitoseindices von Kontrollkulturen und von in G1 mit NE behandelten Zellen werden miteinander verglichen (Tab.55). Eine Beeinflußung des MI konnte bei einer Kulturdauer von 72 Stunden nur nach Behandlung mit 8-16 Einheiten NE nachgewiesen werden.

TABELLE 55:

MITOSEINDEX IN LEUKOZYTENKULTUREN NACH EINER G1-BEHANDLUNG MIT NE.

Die Zellen wurden zur 20. Kulturstunde mit verschiedenen Dosen NE behandelt.

Behandlungsdauer NE 30 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 72 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung.

Behandlung	Mitosenindex in %*
K0	8,2
2-4 Einh. NE	7,3
4-8 Einh. NE	8,1
6-12Einh. NE	8,5
8-16Einh. NE	5,6

* jeweils 1000 ausgewertete Interphasen

Es wurde der Mitoseindex von Kontrollkulturen und von in der G1-Phase des Zellzyklus mit NE behandelten Zellen miteinander verglichen (Tab.56). In Kontrollkulturen lag der Mitoseindex nach einer Kulturdauer von 50 Stunden bei 3,4%. Bei Behandlung mit 12-24 Einheiten NE sank er bis auf 0% ab.

TABELLE 56:

MITOSEINDEX IN LEUKOZYTENKULTUREN NACH EINER G1-BEHANDLUNG MIT NE.

Die Zellen wurden zur 20. Kulturstunde mit verschiedenen Dosen NE behandelt.

Behandlungsdauer NE 30 Minuten bei 37° C

Kulturdauer 50 h einschließlich 5 h Colcemidbehandlung

Behandlung	Mitoseindex in %*
K0	3,4
2-4 Einh.NE	1,8
4-8 Einh.NE	0,4
8-16Einh.NE	0,1
12-24Einh.NE	0,0

* 1000 ausgewertete Interphasen

Es wurde der MI nach Trenimonbehandlung bestimmt (Tab.57). Nur bei der höchsten getesteten Trenimonkonzentration ($1 \times 10^{-7} \text{M}$) sank der MI ab (3,8%). Auch die NE-Behandlung hatte kaum einen Einfluß auf den MI.

TABELLE 57:

MITOSEINDEX IN LEUKOZYTENKULTUREN NACH BEHANDLUNG MIT TRENIMON UND NE.

Die Behandlungsbedingungen für Trenimon und NE sind aus Tabelle 52 ersichtlich.

Behandlung	Mitoseindex in %*
$5 \times 10^{-9} \text{M}$	6,6
$5 \times 10^{-9} \text{M} + \text{NE}$	4,9
$1 \times 10^{-8} \text{M}$	6,0
$1 \times 10^{-8} \text{M} + \text{NE}$	3,4
$5 \times 10^{-8} \text{M}$	7,6
$5 \times 10^{-8} \text{M} + \text{NE}$	3,4
$1 \times 10^{-7} \text{M}$	3,8
$1 \times 10^{-7} \text{M} + \text{NE}$	4,8
KO	7,2

* jeweils 1000 ausgewertete Interphasen

3. CHO-Kulturen, Auswertung auf strukturelle Aberrationen

Es wurden Experimente mit 13 verschiedenen Chemikalien und Röntgenstrahlen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden nach folgenden Gesichtspunkten geordnet: 3.1. Im Testsystem positive Substanzen und 3.2. Im Testsystem negative Substanzen.

Zu 3.1.: Mit diesem Testsystem sollte analysiert werden, ob durch eine G2-Nachbehandlung von CHO-Zellen mit NE+V die mutageninduzierte Aberrationsrate gesteigert werden kann. War die Aberrationsrate durch die NE+V-Behandlung mindestens verdoppelt im Vergleich zu der nur mit dem Mutagen behandelten Kultur, wurde der Test als positiv gewertet. Ausreichend war eine Verdopplung der Aberrationsrate in der höchsten getesteten Konzentration. Induzierte die Mutagenbehandlung allein weniger als 5% aberrante Mitosen, mußte die Aberrationsrate nach NE+V-Behandlung dreifach sein. Folgende acht Substanzen waren in diesem Testsystem positiv: Bleomycin Röntgenstrahlen, Koffein, Dimethylsulfat, Ethylmethansulfonat, Methylnitrosourea, Methyl-Nitro-Nitroso-Guanidin und 4-Nitroquinolin-Oxid.

Zu 3.2.: Der Test wird als negativ bewertet, wenn auch in der höchstmöglichen Mutagenkonzentration die Aberrationsrate durch die NE+V-Zugabe nicht gesteigert werden konnte. Bei folgenden sechs Chemikalien ließen sich die Aberrationsraten durch die NE+V-Behandlung nicht beeinflussen: Benzidin, Diepoxybutan, Diethylstilbestrol, Ethylnitrosourea, Hydrazin-Sulfat und Trenimon.

3.1. G2-Mutagenbehandlung, Nachbehandlung mit NE+V (im Testsystem positive Substanzen)

3.1.1. G2-Behandlung mit Bleomycin, NE+V

Folgende BLM Konzentrationen wurden getestet: 1, 5, 10 und 50 µg/ml. BLM allein induzierte maximal 11 B' in 100 Mitosen, Nachbehandlung mit NE+V steigerte die Rate der Chromatidbrüche auf 54 in 100 Mitosen. Die Translokationen stiegen durch die NE+V-Behandlung von 4 auf 13 in 100 Mitosen. Dizentrische Chromosomen und Ringchromosomen sowie Chromosomenbrüche kamen nicht vor (Tab.58).

TABELLE 58:

EINFLUSS EINER G2-NACHBEHANDLUNG MIT NE+V AUF BLM INDUZIERT E STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN CHO-KULTUREN.

Die Zellen wurden für 30 Minuten mit BLM behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden NE+V zugegeben (15 Min. in Eis, 15 Min. bei 37° c), Behandlungsdauer Colcemid 2,5 h

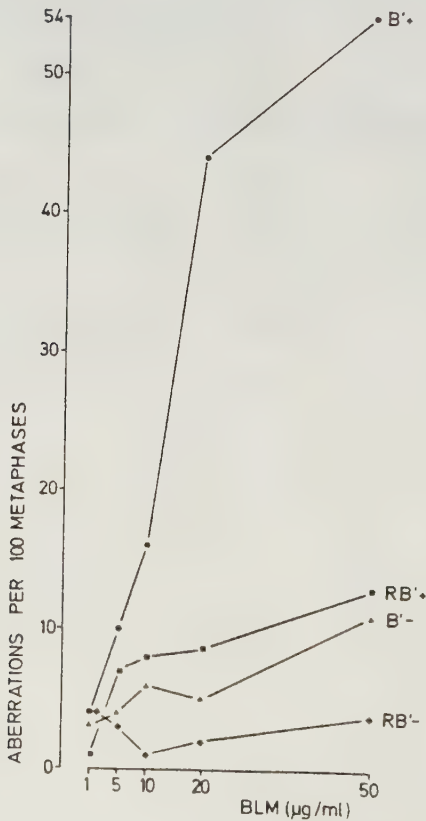
Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen				Bruchrate
			A1	B'	RB'	Dic+Ring	
1 µg/ml	100	5,0	12,0	3,0	4,0	-	11,0
1 µg/ml+NE+V	100	5,0	29,0	4,0	1,0	-	6,0
5 µg/ml	100	5,0	15,0	4,0	3,0	-	10,0
5 µg/ml+NE+V	100	13,0	51,0	10,0	7,0	-	24,0
10 µg/ml	100	5,0	39,0	6,0	1,0	-	8,0
10 µg/ml+NE+V	100	16,0	82,0	16,0	8,0	-	32,0
20 µg/ml	100	6,0	37,0	5,0	2,0	-	9,0
20 µg/ml+NE+V	92	32,6	118,0	44,0	8,7	-	61,4
50 µg/ml	100	13,0	30,0	11,0	4,0	-	19,0
50 µg/ml+NE+V	100	38,0	111,0	54,0	13,0	-	80,0
K0	100	1,0	6,0	1,0	-	-	1,0

ABBILDUNG 7:

Chromatidenaberrationen in CHO-Kulturen nach BLM und NE+V-Behandlung in der G2-Phase des Zellzyklus.

Die Abbildung zeigt die Daten aus Tabelle 58.

- B' - : Chromatidbrüche in BLM behandelten Kulturen
B' + : Chromatidbrüche in BLM und NE+V behandelten Kulturen
RB' - : Chromatidentranslokationen in BLM behandelten Kulturen
RB' + : Chromatidentranslokationen in BLM und NE+V behandelten Kulturen



3.1.2. G2-Behandlung mit Röntgenstrahlen, NE+V

Die CHO-Zellen wurden mit folgenden Dosen bestrahlt: 50, 100, 150 und 200 R (Tab.59). Für jede Dosis wurden drei Kulturen angesetzt: Eine Kultur wurde nur bestrahlt, eine bestrahlt und mit NE nachbehandelt und eine weitere bestrahlt und mit NE+V nachbehandelt. Nachbehandlung mit NE allein führte zu einer deutlichen Steigerung der Chromatiden-aberrationen. Nachbehandlung mit NE+V hatte keine höheren Aberrationsraten zur Folge als die Nachbehandlung mit NE allein. Chromosomen-brüche wurden nicht, Dizentrische-und Ringchromosomen nur vereinzelt gefunden.

TABELLE 59:

EINFLUSS EINER G2-NACHBEHANDLUNG MIT NE+V AUF RÖNTGENSTRAHLEN INDUZIERT E STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN CHO-KULTUREN.

Die Zellen wurden sofort nach der Bestrahlung mit NE+V behandelt (15 Min. in Eis, 15 Min. bei 37° C), Behandlungsdauer Colcemid 2,5 h

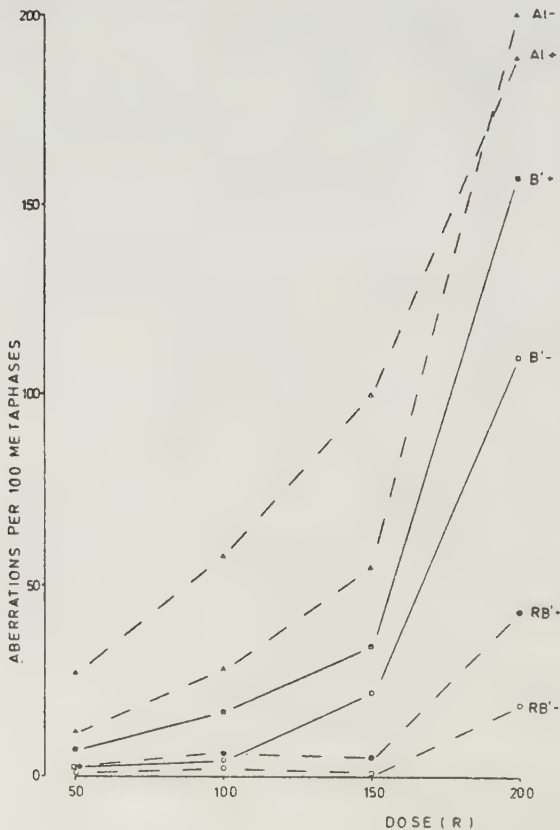
Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen				Bruchrate
			A1	B'	RB'	Dic+Ring	
50 R	100	3,0	12,0	2,0	1,0	-	4,0
50 R+NE	100	9,0	28,0	8,0	1,0	-	10,0
50 R+NE+V	100	9,0	27,0	7,0	2,0	1,0	13,0
100 R	100	6,0	28,0	4,0	2,0	-	8,0
100 R+NE	100	17,0	54,0	14,0	4,0	-	22,0
100 R+NE+V	120	18,4	57,5	16,7	5,8	-	28,3
150 R	110	17,3	54,5	21,8	0,9	1,8	27,2
150 R+NE	100	30,0	115,0	29,0	1,0	-	31,0
150 R+NE+V	100	31,0	100,0	34,0	5,0	2,0	48,0
200 R	92	55,4	201,0	109,8	18,5	-	146,8
200 R+NE+V	35	77,1	188,6	157,1	42,9	-	242,9
K0	100	4,0	22,0	4,0	-	-	4,0

ABBILDUNG 8:

Chromatidenaberrationen in CHO-Zellen nach Röntgenbestrahlung und NE+V Behandlung in der G2-Phase des Zellzyklus.

Die Abbildung zeigt die Daten aus Tabelle 59.

- A1 - : Achromatische Läsionen in bestrahlten Kulturen
- A1 + : Achromatische Läsionen in bestrahlten und mit NE+V behandelten Kulturen
- B' - : Chromatidbrüche in bestrahlten Kulturen
- B' + : Chromatidbrüche in bestrahlten und mit NE+V behandelten Kulturen
- RB' - : Chromatidentranslokationen in bestrahlten Kulturen
- RB' + : Chromatidentranslokationen in bestrahlten und mit NE+V behandelten Kulturen



3.1.3. G2-Behandlung mit Dimethylsulfat, NE+V *

Es wurden zwei Versuche durchgeführt (Tab.60a,b). Behandlung mit $0,3 \times 10^{-4} \text{ M}$ DMS erhöhte die Bruchrate nicht über Kontrollniveau. Nachbehandlung mit NE+V hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die Aberrationsrate. $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ DMS führte zu 5 B', $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ DMS zu 120 B' in 100 Mitosen. Nachbehandlung mit NE+V erhöhte diese Raten auf 22 B' und 214 B' in 100 Mitosen. Chromosomenaberrationen wurden nicht vermehrt durch die NE+V Behandlung gefunden.

TABELLE 60 a:

EINFLUSS EINER G2-NACHBEHANDLUNG MIT NE+V AUF DMS INDUZIERTER STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN CHO-KULTUREN.

Die Zellen wurden für 30 Minuten mit DMS behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden NE+V zugegeben (15 Min. in Eis, 15 Min. bei 37° C); Behandlungsdauer Colcemid 3 h

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	Aberrationen in 100 Mitosen				Dic+Ring	Bruchrate
		Al	B'	B''	RB'		
$0,3 \times 10^{-4} \text{ M}$	50	1,0	1,0	-	-	-	1,0
$0,3 \times 10^{-4} \text{ M} + \text{NE+V}$	50	4,0	4,0	-	-	-	4,0
$1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$	100	7,0	7,0	1,0	-	-	8,0
$1,0 \times 10^{-4} \text{ M} + \text{NE+V}$	100	8,0	17,0	3,0	5,0	2,0	34,0
KO	50	2,0	4,0	-	-	-	4,0

TABELLE 60 b:

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	Aberrationen in 100 Mitosen				Dic+Ring	Bruchrate
		Al	B'	B''	RB'		
$1 \times 10^{-4} \text{ M}$	100	8,0	3,0	2,0	-	-	5,0
$1 \times 10^{-4} \text{ M} + \text{NE+V}$	100	21,0	27,0	2,0	-	-	29,0
$3 \times 10^{-4} \text{ M}$	50	52,0	120,0	-	6,0	-	132,0
$3 \times 10^{-4} \text{ M} + \text{NE+V}$	50	162,0	214,0	6,0	14,0	2,0	252,0
KO	50	3,0	4,0	-	-	-	4,0
KO+NE+V	50	2,0	-	-	-	-	0,0

* Daten von Prof. Dr. A.T. Natarajan, Leiden

3.1.4. G2-Behandlung mit Ethylmethansulfonat, NE+V*

Die Zellen wurden mit $3,6 \times 10^{-2} \text{M}$, $4,8 \times 10^{-2} \text{M}$ und $7,2 \times 10^{-2} \text{M}$ EMS behandelt und anschließend mit NE+V nachbehandelt (Tab.61). Behandlung mit $7,2 \times 10^{-2} \text{M}$ EMS induzierte 11 B' in 100 Mitosen, Nachbehandlung mit NE+V 28 B'. Translokationen, Dizentrische- und Ringchromosomen kamen nicht vermehrt vor.

TABELLE 61:

Einfluss einer G2-Nachbehandlung mit NE+V auf EMS induzierte strukturelle Aberrationen in CHO-Kulturen.

Die Zellen wurden für 30 Minuten mit EMS behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden NE+V zugegeben (15 Min. in Eis, 15 Min. bei 37°C); Behandlungsdauer Colcemid 3 h

Behandlung	Anzahl ausgewerteter Mitosen	Aberrationen in 100 Mitosen				Dic+Ring	Bruchrate
		A1	B'	B''	RB'		
$3,6 \times 10^{-2} \text{M}$	100	5,0	4,0	-	1,0	-	6,0
$3,6 \times 10^{-2} \text{M} + \text{NE+V}$	100	8,0	10,0	-	-	1,0	12,0
$4,8 \times 10^{-2} \text{M}$	100	3,0	8,0	-	-	1,0	10,0
$4,8 \times 10^{-2} \text{M} + \text{NE+V}$	100	25,0	28,0	1,0	-	-	29,0
$7,2 \times 10^{-2} \text{M}$	100	5,0	11,0	2,0	1,0	-	15,0
$7,2 \times 10^{-2} \text{M} + \text{NE+V}$	100	25,0	28,0	1,0	-	-	29,0
KO	100	3,0	4,0	-	-	-	4,0
KO+NE+V	100	2,0	-	-	-	-	0,0

3.1.5. G2-Behandlung mit Koffein, NE+V

Die Koffeinbehandlung erfolgte mit $1 \times 10^{-2} \text{M}$, $5 \times 10^{-2} \text{M}$ und $1 \times 10^{-1} \text{M}$ (Tab.62a,b). Die beiden höchsten Konzentrationen waren positiv im Test. Koffein allein induzierte maximal 24 B', nach NE+V Behandlung wurden 66 B' in 100 Mitosen gefunden. Chromosomenbrüche, Translokationen, Dizentrische- und Ringchromosomen wurden durch die Koffeinbehandlung induziert, blieben durch die Behandlung mit NE+V aber weitgehend unbeeinflusst.

TABELLE 62 a:

EINFLUSS EINER G2-NACHBEHANDLUNG MIT NE+V AUF KOFFEIN INDUZIERT E STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN CHO-KULTUREN.

Die Zellen wurden für 30 Minuten mit Koffein behandelt (Pulsbehandlung).

Anschließend wurden NE+V zugegeben (15 Min. in Eis, 15 Min. 37° C).

Behandlungsdauer Colcemid 2 h.

Behandlung	Anzahl ausgewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
$1 \times 10^{-2} \text{M}$	100	2,0	3,0	-	1,0	1,0	-	3,0
$1 \times 10^{-2} \text{M} + \text{NE} + \text{V}$	100	8,0	14,0	7,0	1,0	-	1,0	10,0
$5 \times 10^{-2} \text{M}$	100	4,0	10,0	4,0	-	-	-	4,0
$5 \times 10^{-2} \text{M} + \text{NE} + \text{V}$	100	11,0	35,0	8,0	-	3,0	-	14,0
$1 \times 10^{-1} \text{M}$	60	23,0	217,0	10,0	17,0	3,0	-	33,0
$1 \times 10^{-1} \text{M} + \text{NE} + \text{V}$	44	41,0	346,0	46,0	23,0	-	-	69,0

TABELLE 62 b*:

Behandlung	Anzahl ausgewerteter Mitosen	Aberrationen in 100 Mitosen				Dic+Ring	Bruchrate
		A1	B'	B''	RB'		
$1 \times 10^{-2} \text{M}$	100	1,0	-	-	-	-	0,0
$1 \times 10^{-2} \text{M} + \text{NE} + \text{V}$	100	11,0	3,0	-	-	-	3,0
$5 \times 10^{-2} \text{M}$	100	6,0	8,0	2,0	3,0	3,0	22,0
$5 \times 10^{-2} \text{M} + \text{NE} + \text{V}$	100	18,0	36,0	9,0	7,0	1,0	61,0
$1 \times 10^{-1} \text{M}$	50	5,0	24,0	6,0	12,0	-	54,0
$1 \times 10^{-1} \text{M} + \text{NE} + \text{V}$	50	62,0	66,0	8,0	4,0	2,0	86,0
KO	50	1,0	1,0	-	-	-	1,0
KO+NE+V	50	3,0	2,0	-	-	-	2,0

* Daten von Prof. Dr. A.T. Natarajan, Leiden

3.1.6. G2-Behandlung mit Methylnitrosourea, NE+V

Es wurden zwei Versuche durchgeführt und die Daten in Tabelle 63 zusammengefaßt. Bei einer MNU Konzentration von $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ wurden 13 B', bei $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ 19 B' und bei $9 \times 10^{-3} \text{ M}$ 102 B' in 100 Mitosen gefunden. Nach der Behandlung mit NE+V wurden 21 B' ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$), 53 B' ($3 \times 10^{-3} \text{ M}$) und 194 B' ($9 \times 10^{-3} \text{ M}$) gefunden. Die Anzahl der Translokationen, Dizentrischen- und Ringchromosomen lag über Kontrollniveau, zeigte aber keine eindeutige Abhängigkeit von der NE+V Behandlung.

TABELLE 63:

EINFLUSS EINER G2-NACHBEHANDLUNG MIT NE+V AUF MNU INDUZIERTES STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN CHO-KULTUREN.

Die Zellen wurden für 30 Minuten mit MNU behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden NE+V zugegeben (15 Min. in Eis, 15 Min. bei 37° C); Behandlungsdauer Colcemid 3 h.

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	Aberrationen in 100 Mitosen				Dic+Ring	Bruchrate
		Al	B'	B''	RB'		
$3 \times 10^{-4} \text{ M}$	100	7,0	7,0	-	-	1,0	9,0
$3 \times 10^{-4} \text{ M} + \text{NE+V}$	100	9,0	6,0	-	1,0	-	8,0
$1 \times 10^{-3} \text{ M}$	200	7,0	13,0	-	-	0,5	14,0
$1 \times 10^{-3} \text{ M} + \text{NE+V}$	200	11,0	21,0	2,0	0,5	-	24,0
$3 \times 10^{-3} \text{ M}$	100	15,0	19,0	3,0	-	2,0	26,0
$3 \times 10^{-3} \text{ M} + \text{NE+V}$	100	14,0	53,0	2,0	8,0	3,0	27,0
$9 \times 10^{-3} \text{ M}$	50	98,0	102,0	-	8,0	-	118,0
$9 \times 10^{-3} \text{ M} + \text{NE+V}$	50	176,0	194,0	5,0	2,0	2,0	207,0
K0	100	1,0	2,0	-	-	-	2,0
K0+NE+V	100	7,0	10,0	1,0	-	-	11,0

3.1.7. G2-Behandlung mit Methyl-Nitro-Nitroso-Guanidin, NE+V

Es wurden drei Versuche durchgeführt. Im ersten Versuch wurden die Zellen mit $1 \times 10^{-7} \text{ M}$, $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ und $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ MNNG behandelt. Die Aberrationsrate stieg durch die Behandlung mit MNNG nur geringfügig über Kontrollniveau an (Tab.64a). Nachbehandlung mit NE+V hatte nur bei der höchsten MNNG Konzentration von $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ eine Verdopplung der Aberrationsrate zur Folge.

TABELLE 64 a:

EINFLUSS EINER G2-NACHBEHANDLUNG MIT NE+V AUF MNNG INDUZIERTER STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN CHO-KULTUREN.

Die Zellen wurden für 30 Minuten mit MNNG behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden NE+V zugegeben (15 Min. in Eis, 15 Min. bei 37° C); Behandlungsdauer Colcemid 2,5 h

Behandlung	Anzahl ausgewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen				Bruchrate
			A1	B'	RB'	Dic+Ring	
$1 \times 10^{-5} \text{ M}$	100	5,0	15,0	5,0	-	-	5,0
$1 \times 10^{-5} \text{ M} + \text{NE+V}$	100	11,0	46,0	11,0	-	-	11,0
$1 \times 10^{-6} \text{ M}$	100	4,0	12,0	4,0	-	-	4,0
$1 \times 10^{-6} \text{ M} + \text{NE+V}$	100	4,0	13,0	2,0	-	2,0	6,0
$1 \times 10^{-7} \text{ M}$	100	2,0	5,0	2,0	-	-	3,0
$1 \times 10^{-7} \text{ M} + \text{NE+V}$	100	0,0	-	-	-	-	0,0

In einem zweiten Versuch wurden die Zellen zusätzlich zu den oben beschriebenen Konzentrationen mit $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ MNNG behandelt (Tab.64b). Auch in diesem Experiment führte die Nachbehandlung mit NE+V in der höchsten MNNG Konzentration zu einem deutlich positiven Testergebnis.

TABELLE 64 b:

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen				Bruchrate
			A1	B'	RB'	Dic+Ring	
$2 \times 10^{-5} \text{ M}$	100	0,0	4,0	-	-	-	0,0
$2 \times 10^{-5} \text{ M} + \text{NE} + \text{V}$	100	8,0	34,0	6,0	1,0	1,0	10,0
$1 \times 10^{-5} \text{ M}$	100	4,0	10,0	4,0	-	-	4,0
$1 \times 10^{-5} \text{ M} + \text{NE} + \text{V}$	100	3,0	16,0	2,0	-	1,0	4,0
$1 \times 10^{-6} \text{ M}$	100	4,0	3,0	2,0	-	2,0	6,0
$1 \times 10^{-6} \text{ M} + \text{NE} + \text{V}$	100	3,0	7,0	2,0	-	2,0	4,0
$1 \times 10^{-7} \text{ M}$	100	2,0	6,0	2,0	-	-	2,0
$1 \times 10^{-7} \text{ M} + \text{NE} + \text{V}$	100	1,0	3,0	-	-	1,0	2,0
K0	100	3,0	-	2,0	1,0	1,0	6,0

Tabelle 64c zeigt die Ergebnisse einer Behandlung mit $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ MNNG und anschließender Nachbehandlung mit NE+V. In diesem Versuch lag die Aberrationsrate in MNNG behandelten Kulturen deutlich höher als in dem in Tabelle 64b beschriebenen Versuch. Nach MNNG Behandlung wurden 19 B' in 100 Mitosen gefunden. Nachbehandlung mit NE+V führte zu 109 B' in 100 Mitosen.

TABELLE 64 c

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen				Bruchrate
			A1	B'	RB'	Dic+Ring	
$2 \times 10^{-5} \text{ M}$	100	23,0	33,0	19,0	3,0	-	25,0
$2 \times 10^{-5} \text{ M} + \text{NE} + \text{V}$	31	67,7	187,1	109,7	6,5	3,2	128,9
K0	50	2,0	2,0	2,0	-	-	2,0

Tabelle 64c zeigt die zusammengefaßten Ergebnisse der drei beschriebenen Experimente. Das deutlich positive Testergebnis stützt sich hauptsächlich auf die Daten aus Tabelle 64c. Auffallend in diesen Versuchen war die überdurchschnittlich große Schwankungsbreite der Aberrationsraten bei gleicher MNNG Konzentration und die damit einhergehende Variabilität der NE-Wirkung.

TABELLE 64 d: Zusammengefaßte Daten aus Tabelle 64 a, b, c.

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen				Bruchrate
			A1	B'	RB'	Dic+Ring	
$2 \times 10^{-5} \text{M}$	200	11,5	18,5	9,5	1,5	-	12,5
$2 \times 10^{-5} \text{M} + \text{NE} + \text{V}$	131	21,4	70,2	30,5	2,3	1,5	38,1
$1 \times 10^{-5} \text{M}$	200	4,5	12,5	4,5	-	-	4,5
$1 \times 10^{-5} \text{M} + \text{NE} + \text{V}$	200	7,0	31,0	6,5	-	0,5	7,5
$1 \times 10^{-6} \text{M}$	200	4,0	7,5	3,0	-	1,0	5,0
$1 \times 10^{-6} \text{M} + \text{NE} + \text{V}$	200	3,5	10,0	2,0	-	-	2,0
$1 \times 10^{-7} \text{M}$	200	2,0	5,5	2,0	-	-	2,0
$1 \times 10^{-7} \text{M} + \text{NE} + \text{V}$	200	2,0	5,5	1,5	-	0,5	2,5
KO	250	1,6	0,4	1,2	0,4	0,4	2,8

3.1.8. G2-Behandlung mit 4-Nitroquinolin-Oxid, NE+V

Die Zellen wurden mit folgenden Konzentrationen 4NQO behandelt: $2,1 \times 10^{-6} \text{ M}$, $2,1 \times 10^{-5} \text{ M}$ und $2,1 \times 10^{-4} \text{ M}$. Die Bruchrate lag nach der Mutagenbehandlung im Kontrollbereich (Tab.65). Nachbehandlung mit NE+V führte in der höchsten 4NQO Konzentration zu einem positiven Testergebnis, die Bruchrate wurde durch NE+V vervierfacht.

TABELLE 65 :

EINFLUSS EINER G2-NACHBEHANDLUNG MIT NE+V AUF 4NQO INDUZIERT E STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN CHO-KULTUREN.

Die Zellen wurden für 30 Minuten mit 4NQO behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden NE+V zugegeben (15 Min. in Eis, 15 Min. bei 37° C); Behandlungsdauer Colcemid 2,5 h.

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
$2,1 \times 10^{-6} \text{ M}$	200	2,0	20,5	2,0	-	-	-	2,0
$2,1 \times 10^{-6} \text{ M} + \text{NE+V}$	155	6,5	29,6	5,2	-	1,3	-	7,8
$2,1 \times 10^{-5} \text{ M}$	200	1,0	6,5	1,0	-	-	.	1,0
$2,1 \times 10^{-5} \text{ M} + \text{NE+V}$	200	2,0	6,0	2,5	-	-	-	2,5
$2,1 \times 10^{-4} \text{ M}$	100	1,0	3,0	1,0	-	-	-	1,0
$2,1 \times 10^{-4} \text{ M} + \text{NE+V}$	100	3,0	2,0	4,0	-	-	-	4,0
K0	100	0,0	4,0	-	-	-	-	0,0

3.2. G2-Mutagenbehandlung, Nachbehandlung mit NE+V (im Testsystem negative Substanzen)

3.2.1. G2-Behandlung mit Benzidin, NE+V

Beide Konzentrationen Benzidin ($5,4 \times 10^{-3} \text{ M}$ und $1,1 \times 10^{-2} \text{ M}$) erhöhten die Aberrationsrate nicht über Kontrollniveau (Tab.66). Die Nachbehandlung mit NE+V blieb ohne Erfolg. Eine gesicherte Aussage ist nicht möglich, da Benzidin bei der Zugabe ins Kulturmedium sofort ausfiel und damit keine Konzentrationsangaben möglich sind.

TABELLE 66 :

EINFLUSS EINER G2-NACHBEHANDLUNG MIT NE+V AUF BENZIDIN INDUZIERTER STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN CHO-KULTUREN.

Die Zellen wurden für 30 Minuten mit Benzidin behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden NE+V zugegeben (15 Min. in Eis, 15 Min. bei 37° C); Behandlungsdauer Colcemid 2,5 h.

Behandlung	Anzahl ausgewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen				Bruchrate
			A1	B'	RB'	Dic+Ring	
$5,4 \times 10^{-3} \text{ M}$	100	1,0	2,0	1,0	-	-	1,0
$5,4 \times 10^{-3} \text{ M} + \text{NE+V}$	100	3,0	7,0	1,0	1,0	-	3,0
$1,1 \times 10^{-2} \text{ M}$	77	2,6	5,2	2,6	-	-	2,6
$1,1 \times 10^{-2} \text{ M} + \text{NE+V}$	54	3,7	29,6	3,7	-	-	2,7
K0	50	1,0	6,0	1,0	-	-	1,0

3.2.2. G2-Behandlung mit Diepoxybutan, NE+V

DEB wurde in folgenden Konzentrationen getestet: $6,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ und $1,3 \times 10^{-4} \text{ M}$ (Tab.67). Nach der DEB Behandlung wurden in der höchsten getesteten Konzentration 4 B' und 1 Dic gefunden. In der mit DEB+NE+V behandelten Kultur wurden 3B' und 3 RB' gefunden.

TABELLE 67:

EINFLUSS EINER G2-NACHBEHANDLUNG MIT NE+V AUF DEB INDUZIERT E STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN CHO-KULTUREN.

Die Zellen wurden für 30 Minuten mit (DEB) behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden NE+V zugegeben (15 Min. in Eis, 15 Min. bei 37° C); Behandlungsdauer Colcemid 2,5 h.

Behandlung	Anzahl ausgewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen				Bruchrate
			A1	B'	RB'	Dic+Ring	
$6,5 \times 10^{-5} \text{ M}$	100	2,0	14,0	2,0	-	-	2,0
$6,5 \times 10^{-5} \text{ M} + \text{NE} + \text{V}$	100	3,0	13,0	2,0	-	-	2,0
$1,3 \times 10^{-4} \text{ M}$	100	6,0	18,0	4,0	-	1,0	6,0
$1,3 \times 10^{-4} \text{ M} + \text{NE} + \text{V}$	100	4,0	22,0	3,0	3,0	-	9,0
K0	100	4,0	7,0	4,0	1,0	-	6,0

3.2.3. G2-Behandlung mit Diethylstilbestrol, NE+V

In zwei voneinander unabhängig durchgeführten Konzentrationsreihen wurden die Zellen mit $1,9 \times 10^{-5} \text{ M}$, $3,7 \times 10^{-5} \text{ M}$ und $1,9 \times 10^{-4} \text{ M}$ DES behandelt. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 68 zusammengefaßt. Die Bruchrate lag, auch nach Behandlung mit NE+V, im Kontrollbereich.

TABELLE 68 :

EINFLUSS EINER G2-NACHBEHANDLUNG MIT NE+V AUF DES INDUZIERT E ABERRATIONEN IN CHO-KULTUREN.

Die Zellen wurden für 30 Minuten mit DES behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden NE+V zugegeben (15 Min. in Eis, 15 Min. bei 37° C).

Behandlungsdauer Colcemid 2,5 h.

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen				Bruchrate
			A1	B'	RB'	Dic+Ring	
$1,9 \times 10^{-5} \text{ M}$	200	3,5	4,0	2,5	0,5	0,5	4,5
$1,9 \times 10^{-5} \text{ M} + \text{NE+V}$	200	2,0	4,0	1,5	-	0,5	2,5
$3,7 \times 10^{-5} \text{ M}$	200	1,0	5,0	1,0	-	-	1,0
$3,7 \times 10^{-5} \text{ M} + \text{NE+V}$	200	0,0	14,0	-	-	-	0,0
$1,9 \times 10^{-4} \text{ M}$	200	1,0	4,5	1,0	-	-	1,0
$1,9 \times 10^{-4} \text{ M} + \text{NE+V}$	200	2,0	7,5	1,0	-	-	1,0
KO	100	2,0	2,0	2,0	-	-	2,0

3.2.4. G2-Behandlung mit Ethylnitrosourea, NE+V^{*}

Tabelle 69 zeigt die zusammengefaßten Daten von drei Versuchen. Behandlung mit ENU allein induzierte in allen Konzentrationen deutlich über Kontrollniveau liegende Bruchraten. In Kulturen, die mit der höchsten ENU Konzentration ($7,7 \times 10^{-4} \text{ M}$) behandelt waren, wurden 24,5 B', 2B'' und 0,5 RB' in 100 Mitosen gefunden. In mit NE+V nachbehandelten Kulturen wurden 24,5 B', 4,5 B'' und 0,5 Dic/Ring gefunden. Somit konnte keine Steigerung der Bruchrate durch NE+V-Zugabe erreicht werden. Nur bei einer ENU Konzentration ($2,6 \times 10^{-4} \text{ M}$) war die Bruchrate nach der NE+V-Zugabe vervierfacht. Da dieses Ergebnis nicht bestätigt werden konnte, wurde ENU als negativ im Testsystem gewertet.

TABELLE 69:

EINFLUSS EINER G2-NACHBEHANDLUNG MIT NE+V AUF ENU INDUZIERTE STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN CHO-KULTUREN.

Die Zellen wurden für 30 Minuten mit ENU behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden NE+V zugegeben (15 Min. in Eis, 15 Min. bei 37° C); Behandlungsdauer Colcemid 3 h.

Behandlung	Anzahl ausgewerteter Mitosen	Aberrationen in 100 Mitosen				Dic+Ring	Bruchrate
		A1	B'	B''	RB'		
$1,3 \times 10^{-4} \text{ M}$	50	3,0	9,0	2,0	-	-	11,0
$1,3 \times 10^{-4} \text{ M} + \text{NE+V}$	50	18,0	9,0	-	2,0	-	13,0
$2,6 \times 10^{-4} \text{ M}$	100	22,0	18,0	-	3,0	-	24,0
$2,6 \times 10^{-4} \text{ M} + \text{NE+V}$	87	99,0	75,9	-	13,8	1,3	106,1
$5,1 \times 10^{-4} \text{ M}$	200	8,0	10,5	2,0	0,5	-	13,5
$5,1 \times 10^{-4} \text{ M} + \text{NE+V}$	200	14,0	12,5	2,5	-	-	15,0
$7,7 \times 10^{-4} \text{ M}$	200	8,0	24,5	2,0	0,5	-	27,5
$7,7 \times 10^{-4} \text{ M} + \text{NE+V}$	200	17,5	24,5	4,5	-	0,5	30,0
K0	250	3,2	1,6	-	-	-	1,6
K0+NE+V	250	6,0	6,4	1,2	-	-	7,6

3.2.5. G2-Behandlung mit Hydrazin-Sulfat, NE+V

Im ersten Versuch wurden die Zellen mit folgenden Konzentrationen Hydrazin-Sulfat behandelt: $7,7 \times 10^{-4} \text{ M}$, $3,8 \times 10^{-3} \text{ M}$ und $7,7 \times 10^{-3} \text{ M}$. In einem zweiten Experiment wurde nur noch die höchste Hydrazin-Sulfat Konzentration getestet. Tabelle 70 zeigt die zusammengefaßten Daten beider Versuche. In beiden Experimenten lag die Aberrationsrate, auch nach Behandlung mit NE+V, im Kontrollbereich.

TABELLE 70 :

EINFLUSS EINER G2-NACHBEHANDLUNG MIT NE+V AUF HYDRAZIN-SULFAT INDUZIERTER STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN CHO-KULTUREN.

Die Zellen wurden für 30 Minuten mit Hydrazin-Sulfat (Pulsbehandlung) behandelt.

Anschließend wurden NE+V zugegeben (15 Min. in Eis, 15 Min. bei 37° C);

Behandlungsdauer Colcemid 2,5 h.

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen				Bruchrate
			A1	B'	RB'	Dic+Ring	
$7,7 \times 10^{-4} \text{ M}$	100	2,0	5,0	2,0	-	-	5,0
$7,7 \times 10^{-4} \text{ M} + \text{NE+V}$	100	1,0	14,0	3,0	1,0	-	5,0
$3,8 \times 10^{-3} \text{ M}$	100	2,0	6,0	2,0	-	-	2,0
$3,8 \times 10^{-3} \text{ M} + \text{NE+V}$	100	0,0	9,0	-	-	-	0,0
$7,7 \times 10^{-3} \text{ M}$	200	0,5	7,0	-	-	-	0,0
$7,7 \times 10^{-3} \text{ M} + \text{NE+V}$	200	1,0	12,5	1,0	-	-	1,0
KO	100	2,0	3,0	2,0	-	-	2,0

3.2.6. G2-Behandlung mit Trenimon, NE+V

Bei einer Trenimkonzentration von $8,7 \times 10^{-9} \text{ M}$ wurden 8 B' in 100 Mitosen gefunden. Nachbehandlung mit NE+V hatte 3 B' und 2 RB' zur Folge (Tab.71).

TABELLE 71:

EINFLUSS EINER G2-NACHBEHANDLUNG MIT NE+V AUF TRENIMON INDUZIERT E STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN CHO-KULTUREN.

Die Zellen wurden für 30 Minuten mit Trenimon behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden NE+V zugegeben (15 Min. in Eis, 15 Min. bei 37° C);

Behandlungsdauer Colcemid 3 h.

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
$8,7 \times 10^{-9} \text{ M}$	100	7,0	24,0	8,0	-	-	-	8,0
$8,7 \times 10^{-9} \text{ M} + \text{NE+V}$	100	5,0	28,0	3,0	-	2,0	-	7,0
KO	100	3,0	7,0	3,0	1,0	-	-	4,0

3.3. G1-Mutagenbehandlung, Nachbehandlung mit NE+V

CHO-Zellen in G1 reagieren empfindlicher auf eine Nächstbehandlung mit NE+V als Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus. Für die G1-Experimente wurde deshalb die NE-Konzentration auf die Hälfte (6-12 Einheiten) im Vergleich zu G2-Experimenten (12-24 Einheiten) reduziert. Eine weitere Reduzierung der NE-Konzentration auf 2-4 Einheiten hatte entweder keinen oder nur einen schwachen Einfluß auf die Rate struktureller Aberrationen. Für drei Substanzen (DEB, MMS und Trenimon) wurden Konzentrationsreihen erstellt. Für jede Dosis wurden zwei Kulturen angesetzt. Eine Kultur wurde mit Mutagen und Virus, die zweite mit Mutagen und NE+V behandelt.

3.3.1. G1-Behandlung mit Diepoxybutan, NE+V

Die Zellen wurden in G1 für 30 Minuten mit DEB behandelt. Anschließend erfolgte die NE-Zugabe. Nachbehandlung mit 12-24 Einheiten NE wirkte in DEB behandelten Kulturen cytotoxisch. Nachbehandlung mit 2-4 Einheiten NE (Tab.72) und 375 I.E. Virus führte in den beiden höchsten DEB Konzentrationen ($6,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ und $1,3 \times 10^{-4} \text{ M}$) zu einem schwachen Anstieg der Bruchrate im Vergleich zu den nur mit DEB behandelten Kulturen.

TABELLE 72:

EINFLUSS EINER G1-NACHBEHANDLUNG MIT NE+V AUF DEB INDUZIERT E STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN CHO-KULTUREN.

Die Zellen wurden für 30 Minuten mit DEB behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden NE (2-4 Einh.) und Virus (375 I.E.) zugegeben (15 Min. in Eis, 15 Min. bei 37° C); Erholungsdauer 15 h einschließlich 3 h Colcemidbehandlung.

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
$1,3 \times 10^{-5} \text{ M} + \text{V}$	100	11,0	10,0	4,0	-	6,0	3,0	22,0
$1,3 \times 10^{-5} \text{ M} + \text{NE} + \text{V}$	100	8,0	11,0	3,0	2,0	3,0	-	11,0
$6,5 \times 10^{-5} \text{ M} + \text{V}$	100	16,0	11,0	10,0	4,0	8,0	-	30,0
$6,5 \times 10^{-5} \text{ M} + \text{NE} + \text{V}$	100	23,0	18,0	15,0	2,0	11,0	1,0	41,0
$1,3 \times 10^{-4} \text{ M} + \text{V}$	100	39,0	9,0	28,0	2,0	40,0	3,0	116,0
$1,3 \times 10^{-4} \text{ M} + \text{NE} + \text{V}$	100	46,0	20,0	23,0	2,0	54,0	3,0	139,0
K0	100	4,0	9,0	4,0	-	-	1,0	6,0

Tabelle 73 zeigt die Ergebnisse einer NE-Nachbehandlung mit 6-12 Einheiten auf DEB induzierte strukturelle Aberrationen. Bei allen getesteten DEB Konzentrationen wurde ein deutlicher Anstieg der Chromatidenaberrationen durch die NE-Zugabe gefunden. Die höchste DEB Konzentration ($1,3 \times 10^{-4} M$) induzierte 28 B', 2 B' und 40 RB' in 100 Mitosen. Nach der Behandlung mit NE+V lag die Rate bei 142 B', 21 B' und 121 RB' in 100 Mitosen.

TABELLE 73:

EINFLUSS EINER G1-NACHBEHANDLUNG MIT NE+V AUF DEB INDUZIERT E STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN CHO-KULTUREN.

Die Zellen wurden für 30 Minuten mit DEB behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden NE (6-12 Einh.) und Virus (375 I.E.) zugegeben (15 Min. in Eis, 15 Min. bei 37° C); Erholungsdauer 15 h einschließlich 3 h Colcemidbehandlung.

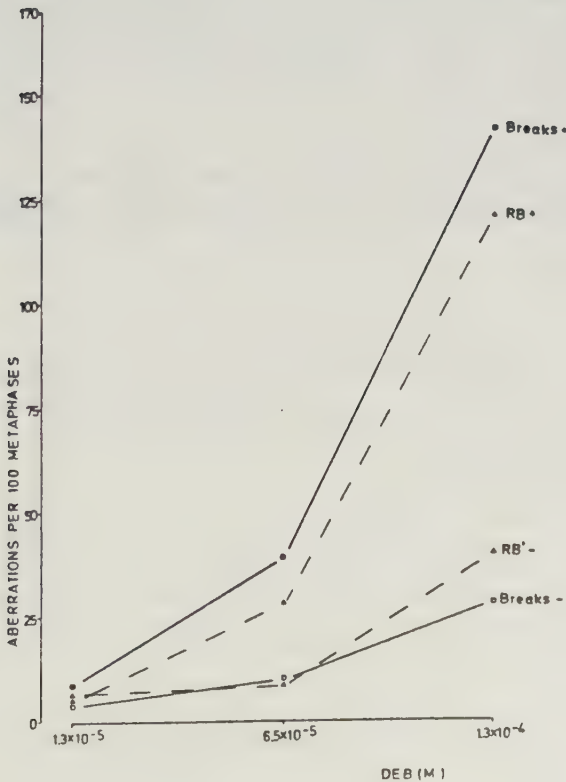
Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			Al	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
$1,3 \times 10^{-5} M+V$	100	11,0	10,0	4,0	-	6,0	3,0	22,0
$1,3 \times 10^{-5} M+NE+V$	100	17,0	9,0	9,0	5,0	5,0	2,0	28,0
$6,5 \times 10^{-5} M+V$	100	16,0	11,0	10,0	4,0	8,0	-	30,0
$6,5 \times 10^{-5} M+NE+V$	100	40,0	24,0	39,0	4,0	28,0	-	99,0
$1,3 \times 10^{-4} M+V$	100	39,0	9,0	28,0	2,0	40,0	3,0	116,0
$1,3 \times 10^{-4} M+NE+V$	57	73,7	22,8	142,0	21,0	121,0	1,8	408,6
K0	100	2,0	4,0	2,0	-	-	-	2,0

ABBILDUNG 9:

Chromosomale Aberrationen in CHO-Kulturen nach DEB und NE+V Behandlung in der G1-Phase des Zellzyklus.

Die Abbildung zeigt die Daten aus Tabelle 73.

- Breaks - : Chromatid-und Chromosomenbrüche in DEB+V behandelten Kulturen
Breaks + : Chromatid-und Chromosomenbrüche in DEB und NE+V behandelten Kulturen
RB' - : Chromatidentranslokationen in DEB+V behandelten Kulturen
RB' + : Chromatidentranslokationen in DEB und NE+V behandelten Kulturen



3.3.2. G1-Behandlung mit Methylmethansulfonat, NE+V

Die Zellen wurden in G1 für 30 Minuten mit verschiedenen Dosen MMS ($0,4 \times 10^{-4} \text{ M}$ bis $1,6 \times 10^{-4} \text{ M}$) behandelt (Tab.74). Die MMS induzierte Aberrationsrate lag nicht über 4%. Die Nachbehandlung mit 4-8 Einheiten NE blieb ohne Einfluß auf die Aberrationsrate.

TABELLE 74:

EINFLUSS EINER G1-NACHBEHANDLUNG MIT NE+V AUF MMS INDUZIERTE STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN CHO-KULTUREN.

Die Zellen wurden für 30 Minuten mit MMS behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden NE (4-8 Einh.) und Virus (375 I.E.) zugegeben.

(15 Min. in Eis, 15 Min. bei 37° C); Erholungsdauer 15 h einschließlich 3 h Colcemidbehandlung.

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
$0,4 \times 10^{-4} \text{ M}$	100	4,0	10,0	-	2,0	-	2,0	6,0
$0,4 \times 10^{-4} \text{ M} + \text{NE}$	100	3,0	11,0	2,0	1,0	-	1,0	5,0
$0,8 \times 10^{-4} \text{ M}$	100	4,0	8,0	1,0	3,0	-	1,0	6,0
$0,8 \times 10^{-4} \text{ M} + \text{NE}$	100	6,0	14,0	4,0	3,0	-	-	7,0
$1,2 \times 10^{-4} \text{ M}$	100	2,0	7,0	-	1,0	-	1,0	3,0
$1,2 \times 10^{-4} \text{ M} + \text{NE}$	100	1,0	9,0	1,0	-	-	-	1,0
$1,6 \times 10^{-4} \text{ M}$	100	1,0	9,0	1,0	-	-	-	1,0
$1,6 \times 10^{-4} \text{ M} + \text{NE}$	100	2,0	18,0	1,0	1,0	-	-	2,0
K0	100	0,0	3,0	-	-	-	-	0,0

In einem weiteren Experiment wurden die Zellen mit 1×10^{-3} M MMS behandelt, was 38% aberrante Mitosen zur Folge hatte (Tab.75). Nachbehandlung mit 2-4 Einheiten NE führte zu 23% aberranten Mitosen.

TABELLE 75:

EINFLUSS EINER G1-NACHBEHANDLUNG MIT NE+V AUF MMS INDUZIERTER STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN CHO-KULTUREN.

Die Zellen wurden in der G1-Phase des Zellzyklus für 30 Minuten mit MMS behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurde NE (2-4 Einh.) zugegeben.

(15 Min. in Eis, 15 Min. bei 37° C); Erholungsdauer 15 h einschließlich 3 h Colcemid-behandlung.

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
1×10^{-3} M+V	100	38,0	12,0	23,0	1,0	36,0	1,0	98,0
1×10^{-3} M+NE+V	100	23,0	17,0	11,0	-	21,0	-	53,0
KO	100	2,0	7,0	2,0	1,0	-	-	3,0

1×10^{-3} M MMS induzierte eine Bruchrate von 98,0. Nachbehandlung mit 6-12 Einheiten NE (Tab.76) führte zu einer Verdopplung der Bruchrate (208,6).

TABELLE 76:

EINFLUSS EINER G1-NACHBEHANDLUNG MIT NE+V AUF MMS INDUZIERTER STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN CHO-KULTUREN.

Die Zellen wurden in der G1-Phase des Zellzyklus für 30 Minuten mit MMS behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurde NE (6-12 Einh.) zugegeben.

(15 Min. in Eis, 15 Min. bei 37° C); Erholungsdauer 15 h einschließlich 3 h Colcemid-behandlung.

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
1×10^{-3} M+V	100	38,0	12,0	23,0	1,0	36,0	1,0	98,0
1×10^{-3} M+NE+V	58	62,1	37,9	72,4	8,6	56,9	6,9	208,6
KO	100	2,0	7,0	2,0	1,0	-	-	3,0

3.3.3. G1-Behandlung mit Trenimon, NE+V

Die Zellen wurden in G1 für 30 Minuten mit Trenimon behandelt. Anschließend erfolgte die NE-Zugabe. Nachbehandlung mit 2-4 Einheiten NE hatte keinen Einfluß auf die Aberrationsrate (Tab.77a). Wurde die NE-Konzentration verdreifacht (6-12 Einheiten), lag bei der höchsten getesteten Trenimonkonzentration ($8,7 \times 10^{-9} \text{M}$) eine Verdopplung der Chromatidenaberrationen vor (Tab.77b). Durch die weitere Erhöhung der NE-Konzentration auf 12-24 Einheiten wurden die Zellen wahrscheinlich so stark geschädigt, daß in den hohen Trenimonkonzentrationen ($8,7 \times 10^{-9} \text{M}$ und $8,7 \times 10^{-8} \text{M}$) ein Absinken der Aberrationsrate nach NE-Zugabe gefunden wurde (Tab.77c).

TABELLE 77 a:

EINFLUSS EINER G1-NACHBEHANDLUNG MIT NE+V AUF TRENIMON INDUZIERT E STRUKTURELLE ABERRATIONEN IN CHO-KULTUREN.

Die Zellen wurden in der G1-Phase des Zellzyklus für 30 Minuten mit Trenimon behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden NE+V zugegeben; Behandlungsdauer 30 Minuten (15 Min. in Eis, 15 Min. bei 37° C); Erholungsdauer 15 Stunden einschließlich 3 h Colcemidbehandlung.

NE-Konzentration 2-4 Einheiten.

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
$8,7 \times 10^{-9} \text{M} + \text{V}$	100	15,0	13,0	11,0	1,0	7,0	1,0	28,0
$8,7 \times 10^{-9} \text{M} + \text{NE} + \text{V}$	100	21,0	19,0	12,0	2,0	5,0	-	24,0
$8,7 \times 10^{-10} \text{M} + \text{V}$	100	5,0	8,0	4,0	1,0	-	1,0	7,0
$8,7 \times 10^{-10} \text{M} + \text{NE} + \text{V}$	100	5,0	7,0	5,0	1,0	-	-	6,0
KO	100	4,0	-	2,0	2,0	-	-	4,0

TABELLE 77 b:

NE-Konzentration 6-12 Einheiten

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
$8,7 \times 10^{-9} \text{M} + \text{V}$	100	15,0	13,0	11,0	1,0	7,0	1,0	28,0
$8,7 \times 10^{-9} \text{M} + \text{NE} + \text{V}$	100	31,0	20,0	20,0	3,0	17,0	2,0	61,0
$8,7 \times 10^{-10} \text{M} + \text{V}$	100	5,0	8,0	4,0	1,0	-	1,0	7,0
$8,7 \times 10^{-10} \text{M} + \text{NE} + \text{V}$	100	15,0	22,0	6,0	4,0	7,0	-	24,0
KO	100	2,0	2,0	2,0	-	-	-	2,0

TABELLE 77 c:

NE-Konzentration 12-24 Einheiten

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	aberrante Mitosen in %	Aberrationen in 100 Mitosen					Bruchrate
			A1	B'	B''	RB'	Dic+Ring	
$8,7 \times 10^{-10} \text{ M+V}$	100	4,0	8,0	2,0	-	-	2,0	6,0
$8,7 \times 10^{-10} \text{ M+NE+V}$	100	8,0	12,0	6,0	2,0	-	-	8,0
$8,7 \times 10^{-9} \text{ M+V}$	100	15,0	18,0	6,0	2,0	8,0	2,0	28,0
$8,7 \times 10^{-9} \text{ M+NE+V}$	100	10,0	16,0	8,0	2,0	-	-	10,0
$8,7 \times 10^{-8} \text{ M+V}$	100	38,0	25,0	36,0	8,0	30,0	-	104,0
$8,7 \times 10^{-8} \text{ M+NE+V}$	81	35,8	48,2	21,0	11,0	13,6	-	59,2
K0	100	1,0	5,0	1,0	-	-	-	0,0

4. CHO-Kulturen, Auswertung auf SCE

4.1. G1-Behandlung mit Diepoxybutan, NE+V

Die Zellen wurden in der G1-Phase des Zellzyklus mit verschiedenen Dosen DEB ($2,6 \times 10^{-6} \text{ M}$ bis $2,6 \times 10^{-5} \text{ M}$) behandelt (Tab.78). Die NE+V-Zugabe (6-12 Einheiten NE und 375 I.E. Virus) erfolgte unmittelbar nach der 30 minütigen DEB Behandlung. Nach 30 Stunden wurden die Zellen fixiert und 2. Mitosen nach Kulturansatz auf SCE ausgewertet. DEB Behandlung führte zu einem dosisabhängigen SCE Anstieg. Nachbehandlung mit NE+V hatte keinen weiteren Anstieg der SCE-Rate zur Folge.

TABELLE 78:

EINFLUSS EINER G1-NACHBEHANDLUNG MIT NE+V AUF DIE DEB INDUZIERT E SCE-RATE BUdR BEHANDELT ER CHO-KULTUREN.

Die Zellen wurden für 30 Minuten mit DEB behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden NE+V und BUdR (10^{-5} M) zugegeben.

Behandlungsdauer 30 Minuten (15 Min. in Eis, 15 Min. bei 37° C).

Erholungsdauer 30 Stunden, einschließlich 4 h Colcemidbehandlung.

Behandlung	Anzahl ausgewerteter Mitosen	SCE pro Mitose	SD	SE
K0	25	9,36	3,1	0,6
K0+NE+V	25	9,60	3,2	0,6
$2,2 \times 10^{-6} \text{ M}$	25	12,76	2,8	0,6
$2,2 \times 10^{-6} \text{ M} + \text{NE} + \text{V}$	25	11,20	2,6	0,5
$6,5 \times 10^{-6} \text{ M}$	25	18,15	3,1	0,6
$6,5 \times 10^{-6} \text{ M} + \text{NE} + \text{V}$	25	17,60	2,2	0,4
$1,3 \times 10^{-5} \text{ M}$	20	25,75	7,3	1,6
$1,3 \times 10^{-5} \text{ M} + \text{NE} + \text{V}$	20	25,30	6,5	1,5
$2,6 \times 10^{-5} \text{ M}$	25	37,56	10,3	2,1
$2,6 \times 10^{-5} \text{ M} + \text{NE} + \text{V}$	25	36,92	11,4	2,3

4.2. G1-Behandlung mit Trenimon, NE+V

Die CHO-Zellen wurden in der G1-Phase des Zellzyklus mit verschiedenen Dosen Trenimon (10^{-9}M , $5 \times 10^{-9}\text{M}$, 10^{-8}M) behandelt (Tab.79). Die NE+V-Zugabe (4-8 Einheiten NE und 375 I.E. Virus) erfolgte unmittelbar nach der 30 minütigen Trenimonbehandlung. Nach 30 Stunden wurden die Zellen fixiert und zweite Mitosen nach Kulturansatz auf SCE ausgewertet. Die Trenimonbehandlung führte zu einem dosisabhängigen Anstieg der SCE-Rate. Nachbehandlung mit NE+V hatte keinen weiteren Anstieg der SCE-Rate zur Folge.

TABELLE 79:

EINFLUSS EINER G1-NACHBEHANDLUNG MIT NE+V AUF DIE TRENIMON INDUZIERTEN SCE-RATE IN BUDR BEHANDELTEN CHO-KULTUREN.

Die Zellen wurden für 30 Minuten mit Trenimon behandelt (Pulsbehandlung). Anschließend wurden NE+V und BUdR (10^{-5}M) zugegeben.

Behandlungsdauer 30 Minuten (15 Min. in Eis, 15 Min. bei 37°C).

Erholungsdauer 30 Stunden, einschließlich 4 h Colcemidbehandlung.

Behandlung	Anzahl ausgewerteter Mitosen	SCE pro Mitose	SD	SE
K0	25	7,84	2,1	0,4
K0+NE+V	25	9,76	2,4	0,5
$1 \times 10^{-9}\text{M}$	25	11,16	1,9	0,4
$1 \times 10^{-9}\text{M} + \text{NE} + \text{V}$	25	11,56	2,1	0,4
$5 \times 10^{-9}\text{M}$	25	30,65	2,9	0,6
$5 \times 10^{-9}\text{M} + \text{NE} + \text{V}$	25	29,50	3,3	0,7
$1 \times 10^{-8}\text{M}$	15	46,27	7,5	1,5
$1 \times 10^{-8}\text{M} + \text{NE} + \text{V}$	15	45,00	6,9	1,4

DISKUSSION

Die Diskussion ist wie folgt gegliedert:

CHO-ZELLEN

- 1.1. Einfluß von NE+V auf Kontrollkulturen in G1 und G2
- 1.2. Einfluß von NE+V auf Mutagen induzierte Läsionen in G2
- 1.3. Einfluß von NE+V auf Mutagen induzierte Läsionen in G1

LYMPHOZYTEN

1. Entwicklung der Methode

- 1.1. Einfluß von NE auf Kontrollkulturen in G0, G1 und G2
- 1.2. Einfluß von NE auf Kontrollkulturen in der S-Phase
- 1.3. Einfluß von NE auf die Zellkinetik
- 1.4. Versuche zur Verbesserung der Permeabilität durch PEG, KCl und Virus

2. Anwendung der Methode

- 2.1. Einfluß von NE auf Mutagen induzierte Läsionen in G0
- 2.2. Einfluß von NE auf Mutagen induzierte Läsionen in G1
- 2.3. Einfluß von NE auf Mutagen induzierte Läsionen in G2
- 2.4. Einfluß von NE auf die Aberrationsrate zu verschiedenen Zeiten nach der Mutagenbehandlung
- 2.5. Achromatische Läsionen und ihre Bedeutung im NE-Testsystem

EINFLUSS VON NE AUF DIE SCE-RATE IN CHO-ZELLEN UND LYMPHOZYTEN

BEWERTUNG DER ERGEBNISSE

- 1.1. Kritische Bewertung des Testsystems
- 1.2. Überprüfung der Aberrationsmodelle mit Hilfe des Testsystems

In der Diskussion verwendete Abkürzungen:

- | | | |
|-----|---|-------------------------|
| NE | = | Neurospora Endonuclease |
| V | = | Sendai Virus |
| SSB | = | DNA-Einzelstrangbruch |
| DSB | = | DNA-Doppelstrangbruch |
| BD | = | Basenschaden |

Ziel dieser Arbeit ist es, Hinweise über die molekularen Grundlagen bei der Entstehung chromosomaler Aberrationen zu bekommen. Alle Modelle zur Aberrationsentstehung sind immer noch hypothetischer Natur, die Mehrzahl der Hinweise für ihre Richtigkeit ist indirekt. Durch die Experimente dieser Arbeit konnte ein direkter Beweis für die Richtigkeit von Benders Modell zur Aberrationsentstehung erbracht werden. Alle Ergebnisse werden in der Diskussion daraufhin überprüft, ob sie mit den Grundgedanken dieses Modells übereinstimmen. Benders Modell weist DNA-Doppelstrangbrüchen bei der Aberrationsentstehung die zentrale Bedeutung zu. Unabhängig von der induzierten Primärläsion wird vermutet, daß sie die direkte Ursache chromosomaler Aberrationen sind.

Vor der Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit werden einige Beweise aus der Literatur für die Beteiligung von DSB an der Entstehung chromosomaler Aberrationen zitiert.

Ein i n d i r e k t e r Beweis für die Beteiligung von DSB an der Aberrationsentstehung konnte durch Experimente mit dem DNA-Synthesehemmer 3-Aminobenzamid (3AB) erbracht werden. 3AB hemmt die Synthese der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase, die an der Reparatur von DSB beteiligt ist (BENJAMIN und GILL 1980). Werden röntgenbestrahlte Lymphozytenkulturen mit 3AB nachbehandelt, führt dies zu einer Verdopplung der Aberrationsrate im Vergleich zu der nur bestrahlten Kultur, weil 3AB die Reparatur von DSB verhindert (NATARAJAN et al. 1982). Dieses Ergebnis zeigt, daß DSB in einem direkten Zusammenhang mit dem Auftreten chromosomaler Aberrationen stehen.

NATARAJAN und OBE (1978) und NATARAJAN et al. (1980) konnten experimentell zeigen, daß DSB d i r e k t an der Entstehung chromosomaler Aberrationen beteiligt sind. Mutagenbehandelte CHO-Zellen wurden mit einem einzelstrangspezifischen Enzym von *Neurospora crassa* (NE) nachbehandelt, was zu einem deutlichen Anstieg der Aberrationsrate führte. Die Autoren deuten ihre Ergebnisse dahingehend, daß einige SSB durch NE in DSB umgewandelt werden, die dann in der nächsten Mitose zu einer erhöhten Aberrationsrate führen.

Außerdem konnte biochemisch (durch Zentrifugation in neutraler Sucrose) an isolierter DNA gezeigt werden, daß eine Nachbehandlung mit NE in röntgenbestrahlten Zellen vermehrt zu DSB führt (NATARAJAN et al. 1980).

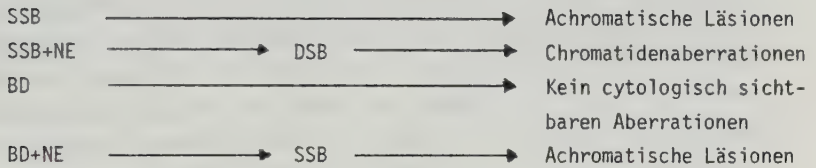
Nach einer Neutronenbestrahlung von CHO-Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus blieb die Nachbehandlung mit NE ohne Einfluß auf die Rate struktureller Aberrationen. Neutronen induzieren hauptsächlich DSB in der DNA, die direkt zu Chromatidenaberrationen führen. NE-Nachbehandlung muß wirkungslos bleiben, weil keine einsträngigen Regionen als Substrat für das Enzym vorhanden sind.

Die Arbeiten von Natarajan und Obe mit dem Endonuclease Testsystem, die sowohl biochemisch als auch cytologisch, den direkten Zusammenhang von DNA-Doppelstrangbrüchen und chromosomalen Aberrationen aufzeigen konnten, dienten als Grundlage für die Experimente dieser Arbeit.

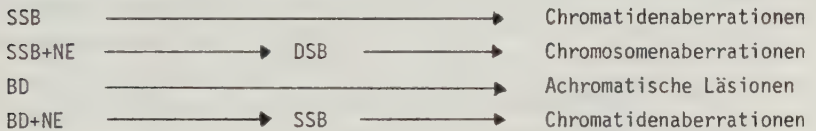
CHO-Zellen und menschliche Lymphozyten wurden zu verschiedenen Zeiten des Zellzyklus mit Mutagenen behandelt und anschließend mit NE nachbehandelt. Die Nachbehandlung mit NE soll einige SSB in DSB überführen, was in der nächsten Mitose, vorausgesetzt DSB sind an der Aberrationsentstehung beteiligt, die Rate chromosomaler Aberrationen erhöhen müßte. Die erwartete Veränderung der Aberrationstypen durch die NE-Behandlung wird im folgenden Schema dargestellt. Diese Übersicht gilt in erster Linie für röntgenbestrahlte Zellen, die SSB, DSB und BD enthalten. Bei der Behandlung mit Alkylantien ist die Induktion der Primärläsion komplexer, man kann davon ausgehen, daß direkt keine Strangbrüche induziert werden, sondern daß SSB hier erst im Verlauf von Reparaturvorgängen oder während der S-Phase entstehen. Trotzdem wird versucht, alle Ergebnisse an Hand des folgenden Schemas zu diskutieren.

Durch Röntgen- bestrahlung induzierte Primärläsion	Läsionstyp nach NE-Be- handlung	Aberrationstyp in der darauffolgenden Mitose
---	---------------------------------------	--

Bestrahlung und NE-Nachbehandlung in G2:



Bestrahlung und NE-Nachbehandlung in G1:



CHO-ZELLEN

1.1. Einfluß von NE+V auf Kontrollkulturen in G1 und G2

Alle Versuche mit CHO-Zellen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. A.T. Natarajan durchgeführt. Deshalb wurden die verfügbaren Kontroll-
daten (siehe NATARAJAN et al. 1980) mit den Daten dieser Arbeit
in Tabelle 80 zusammengefaßt. In Kontrollkulturen induziert Behand-
lung mit NE+V in G1 geringe Raten an Chromatiden- und Chromosomen-
aberrationen. Durch NE in nativer DNA induzierte SSB kommen als Ursache
der erhöhten Aberrationsrate nicht in Frage (SLEIGH und GRIGG 1974).
Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, daß auch in der DNA von unbehandelten
CHO-Zellen einige einsträngige Regionen und SSB vorliegen. Einstrang-
regionen können von NE geschnitten werden, was im Verlauf der S-Phase
zu DSB und in der nächsten Mitose zu Chromatidenaberrationen führt.
SSB werden vor der S-Phase direkt in DSB transformiert, diese zusätz-
lichen DSB bedingen die erhöhte Rate an Chromosomenaberrationen.

In G2 führt eine NE+V-Behandlung ebenfalls zu einer erhöhten Rate an
Chromatidenaberrationen. Somit müssen auch in G2 einige SSB in der
DNA vorliegen. Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Aberrations-
rate ist, daß es an Orten der RNA-Synthese, wo die DNA ungepaart vor-
liegt, vereinzelt zu SSB kommt. Eine sofortige Reparatur wird durch
den räumlichen Abstand zum komplementären Strang erschwert. Ein ver-
gleichbarer Mechanismus wurde von LINDAHL-KIESSLING et al. (1970) für
die Entstehung von Chromatidenaberrationen nach Behandlung mit radio-
aktivem H^3 -Uridin in der G1-Phase des Zellzyklus gefordert.

TABELLE 80:

HAUFIGKEITEN CHROMOSOMALER ABERRATIONEN NACH EINER G1-ODER G2-BEHANDLUNG MIT NE+V
IN CHO KULTUREN ^(a)

Behandlung	Anzahl aus- gewerteter Mitosen	Aberrationen in 100 Mitosen				
		A1	B'	D''	PD'	Dic/Ring
<u>G1-Zellen:</u>						
Kontrolle	350	0,6	0,6	0,3	0,6	-
Kontrolle+NE+V	450	6,2	5,5	4,8	3,1	2,0
<u>G2-Zellen:</u>						
Kontrolle	875	2,7	2,6	-	-	-
Kontrolle+NE+V	1230	5,8	4,1	0,7	0,2	-

^(a) Daten teilweise aus NATARAJAN et al. (1980)

1.2. Einfluß von NE+V auf Mutagen induzierte Läsionen in G2

Mit dem NE-System ist es möglich durch eine Routinetestung selektiv Mutagene nachzuweisen, die Einzelstrangbrüche in der DNA verursachen. Dieser Aspekt steht bei der Diskussion der CHO-Daten im Vordergrund. Es wurden Röntgenstrahlen und verschiedene Chemikalien, wie mono- und polyfunktionelle alkylierende Agenzien, Koffein, Diethylstilbestrol, Benzidin, Hydrazin-Sulfat und 4-Nitroquinolin-Oxid daraufhin untersucht, ob sie bei Behandlung in der G2-Phase des Zellzyklus SSB induzieren. Als Positivkontrolle dienten Röntgenstrahlen und Bleomycin, für beide Mutagene war bekannt, daß eine Nachbehandlung mit NE+V in G2 die Aberrationsrate steigert, was auf einer Umwandlung von SSB in DSB durch NE beruht (NATARAJAN et al. 1980).

Die zusammengefaßten Daten dieser Arbeit werden an Hand von Tabelle 81 diskutiert. In der Tabelle ist für jedes Mutagen die höchste getestete Konzentration, die unterhalb der cytotoxischen Grenze lag, aufgeführt. Ferner wurde die relative Bruchrate, sowie die positive oder negative Bewertung im NE-Test, angegeben. Die relative Bruchrate wurde nur dann bestimmt, wenn die absolute Bruchrate >10 war, geringfügige kulturbedingte Schwankungen könnten sonst leicht zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen führen.

Positiv im NE-Testsystem waren neben den S-Phase-unabhängigen Mutagenen Röntgenstrahlen und Bleomycin auch die monofunktionellen alkylierenden Agentien DMS, EMS, MNU und MNNG. NE-Nachbehandlung in G2 führte bei diesen Substanzen zu einem deutlichen Anstieg der Chromatidenaberrationen. Dieses Ergebnis ist nicht unerwartet, denn es ist bekannt, daß monofunktionelle alkylierende Agenzien Einzelstrangbrüche induzieren (VOGEL und NATARAJAN 1982). Ein Teil dieser SSB wird von NE erkannt und in DSB umgewandelt.

Zudem liegen Daten von NATARAJAN und OBE (1978) vor, die bei Behandlung von CHO-Zellen mit MMS, das ebenfalls monofunktionell alkylierend ist, einen Anstieg der Chromatidenaberrationen durch die Nachbehandlung mit NE fanden.

Die Aberrationsrate wird bei DMS, EMS und MNU durch eine NE-Nachbehandlung nahezu verdoppelt, bei MNNG verdreifacht und bei MMS verfünffacht. Diese unterschiedliche Steigerung der Aberrationsrate durch die NE-Behandlung steht in keinem Zusammenhang mit der Swain-Scott

Konstante (s-Wert). DMS, das einen hohen s-Wert von 0,86 hat, ist ebenso positiv im NE-Testsystem wie MNU mit einem s-Wert von 0,42 (siehe NATARAJAN und VOGEL 1982).

Unerwartet ist das positive Testergebnis von Koffein. NE-Nachbehandlung führte zu einem deutlichen Anstieg der Aberrationsrate, obwohl angenommen wird, daß Koffein keine Strangbrüche in der DNA induziert. Eine Wirkung von Koffein ist die Hemmung der postreplikativen Reparatur in eukaryoten Zellen. Diese Hemmung ist aber wahrscheinlich nicht die Ursache des positiven Ergebnisses im NE-Test.

LEHMAN behandelte Lymphoma Zellen der Maus mit Koffein, was dazu führte, daß nur noch kurze DNA-Sequenzen repliziert wurden. Es wird vermutet, daß Koffein sich an einsträngige replizierende Bereiche anlagert und somit eine vorzeitige Beendigung der Synthese verursacht. Die Replikation muß neu beginnen, was Lücken im neusynthetisierten Strang zur Folge hat. Diese Lücken (SSB) könnten von NE erkannt werden, was nach einer Umwandlung in DSB zu Chromatidenaberrationen in der nächsten Mitose führt.

Wichtig für die Erklärung der Ergebnisse dieser Arbeit sind die biochemischen Experimente von SLEIGH und GRIGG (1974). Die Autoren behandelten DNA mit NE, zum Nachweis einsträngiger oder denaturierter Bereiche. Radioaktiv markierte DNA wurde mit Koffein behandelt und mit NE nachbehandelt. Anschließend wurde die DNA hitzedenaturiert und die Paritkelgröße bestimmt. Folgende Ergebnisse wurden gefunden:

- (1) Native DNA, die mit Koffein oder NE inkubiert wurde, zeigte keine Veränderungen im Vergleich zu nicht behandelter DNA.
- (2) Wurde die DNA mit Koffein und NE behandelt, konnten DNA-Strangbrüche nachgewiesen werden.

Die Autoren interpretieren ihre Ergebnisse dahingehend, daß Koffein die Sekundärstruktur der DNA so verändert, daß sie als Substrat für das einzelstrangspezifische Enzym fungiert.

Die Ergebnisse von SLEIGH und GRIGG (1974) können den Anstieg der Chromatidenaberrationen nach G2-Behandlung mit Koffein und NE erklären. Ferner konnten sie einen weiteren biochemischen Beweis erbringen, daß ungeschädigte DNA in vitro kein Substrat für NE ist.

Das positive Testergebnis mit 4NQO ist nicht abgesichert. In allen getesteten Konzentrationen wurde zwar eine Steigerung der Bruchrate durch die NE-Nachbehandlung gefunden, sie ist aber zu gering, um bei der Anzahl ausgewerteter Metaphasen (100-200 pro Konzentration) als signifikant zu gelten.

HORIKAWA et al. (1970), TADA und TADA (1971) und WALKER und SRIDHAR (1976) konnten zeigen, daß die Addukte, die 4NQO mit der DNA bildet, hydrolytisch gespalten werden. Als Folge davon entstehen Einzelstrangbrüche. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, daß NE einige dieser SSB erkennt und sie in DSB transformiert, was die erhöhte Rate an Chromatidenaberrationen bedingt.

TABELLE 81a: G2-Behandlung von CHO-Zellen, positives Testergebnis

Testsubstanz	NE+V-Behandlung	maximale Mutagen-dosis	relative Bruchrate
Bleomycin (BLM)	- +	50µg/ml	1,0 4,2
Röntgenstrahlen	- +	200 R	1,0 1,7
Dimethylsulfat* (DMS)	- +	$3 \times 10^{-4} \text{ M}$	1,0 1,9
Ethylmethan-sulfonat(EMS)*	- +	$7 \times 10^{-2} \text{ M}$	1,0 1,9
Methylnitroso-urea (MNU)*	- +	$9 \times 10^{-3} \text{ M}$	1,0 1,8
Koffein	- +	$1 \times 10^{-1} \text{ M}$	1,0 1,6
Methyl-Nitro-Nitroso-Guanidin (MNNG)	- +	$2 \times 10^{-5} \text{ M}$	1,0 2,9
4-Nitroquinolin-Oxid (4NQO)	- +	$2 \times 10^{-2} \text{ M}$	-(a)

* Daten von Prof. Dr. A.T. Natarajan, Leiden

(a) Keine Angabe. Die absolute Bruchrate liegt unter 10 (Bruchrate errechnet sich aus: $B' = 1; B'' = 1; RB' = 2; Dic = 2; Ring = 2$).

Negativ im NE-Test sind die polyfunktionellen alkylierenden Agenzien DEB und Trenimon. Im Unterschied zu den monofunktionellen Alkylantien, die SSB induzieren, bilden polyfunktionelle Alkylantien hauptsächlich cross-links mit der DNA. Falls NE diese cross-links erkennt und im gegenüberliegenden Strang einschneidet, führt dies zu SSB, die nicht zu Chromatidenaberrationen, sondern zu Achromatischen Läsionen führen, wenn die Behandlung in der G2-Phase des Zellzyklus erfolgt. Ebenfalls negativ im NE-Test mit G2-Zellen waren das synthetische Östrogen DES, Benzidin und Hydrazin-Sulfat. Benzidin fiel in allen Konzentrationen bei der Zugabe ins Kulturmedium aus, was eine Bewertung unmöglich macht. Die Induktion der Primärläsion durch DES und Hydrazin-Sulfat ist noch nicht eindeutig geklärt, das Ergebnis im NE-Test zeigt aber, daß diese Substanzen wahrscheinlich keine SSB induzieren.

Überraschend ist das negative Testergebnis mit ENU. Als monofunktionelles alkylierendes Agens induziert es SSB (VOGEL und NATARAJAN 1982), die für NE erkennbar sein sollten. In einer Versuchsreihe (siehe Ergebnisteil, Tab.69) konnte eine Steigerung der Bruchrate durch die Nachbehandlung mit NE+V erreicht werden. Dieses Ergebnis war in weiteren Versuchen nicht reproduzierbar, gibt aber einen deutlichen Hinweis darauf, daß ENU Einzelstrangbrüche induziert.

Werden A1 als Beurteilungskriterium miteinbezogen, ergibt sich ein fast durchgehend positiver NE-Effekt. Auf Grund der Bruchrate positiv eingestufte Substanzen zeigen ebenfalls einen deutlichen Anstieg der A1-Frequenzen nach NE-Behandlung. Zusätzlich wurde auch bei den im Hinblick auf die Bruchrate negativ beurteilten Substanzen, mit Ausnahme der polyfunktionellen alkylierenden Agenzien DEB und Trenimon, eine Erhöhung der A1-Rate durch die Nachbehandlung mit NE+V induziert.

NATARAJAN und OBE (1978) fanden auch nach UV- und Mitomycin C Behandlung und anschließender NE-Nachbehandlung eine Erhöhung der A1-Frequenzen, ohne daß die Bruchrate gesteigert war.

Tabelle 81b gibt einen Überblick über die im NE-Test negativ bewerteten Substanzen.

TABELLE 81b: G2-Behandlung von CHO-Zellen, negatives Testergebnis

Testsubstanz	NE+V-Be- handlung	maximale Mutagen- dosis	relative Bruchrate
Benzidin	- +	$1 \times 10^{-2} \text{ M}$	-(a)
Diepoxybutan (DEB)	- +	$1 \times 10^{-4} \text{ M}$	-(a)
Diethylstil- bestrol	- +	$2 \times 10^{-4} \text{ M}$	-(a)
Ethylnitroso- urea (ENU) [*]	- +	$8 \times 10^{-4} \text{ M}$	1,0 1,1
Hydrazin- Sulfat	- +	$8 \times 10^{-3} \text{ M}$	-(a)
Trenimon	- +	$9 \times 10^{-9} \text{ M}$	-(a)

* Daten von Prof. Dr. A.T. Natarajan, Leiden

(a) keine Angabe. Die absolute Bruchrate liegt unter 10 (Bruchrate errechnet sich aus: $B'=1$; $B''=1$; $RB'=2$; $Dic=2$; $Ring=2$).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das NE-Testsystem bei CHO-Zellen geeignet ist, Mutagene nach Art der induzierten Primärläsion in zwei Klassen einzuteilen:

Positiv im NE-Test
bei G2-Behandlung

Diese Substanzen
induzieren SSB

Negativ im NE-Test
bei Behandlung in G2

Diese Substanzen
induzieren keine SSB

Nach Mutagenbehandlung werden in eukaryoten Zellen zwei verschiedene Reparaturtypen, nämlich "short patch Reparatur" und "long patch Reparatur", gefunden. Es soll hier diskutiert werden, ob eine Korrelation des Reparaturtyps und der Bewertung im NE-Testsystem vorliegt. NATARAJAN und OBE (1978) fanden, daß nur Substanzen, die eine "short patch Reparatur" bedingen (Röntgenstrahlen, BLM, MMS) positiv im NE-Test sind. Substanzen, die eine "long patch Reparatur" (UV-Licht) bedingen, sind negativ in diesem Testsystem. Als Ursache wird vermutet, daß einsträngige DNA-Bereiche, die durch "long patch Reparatur" entstehen, in G2 nicht durch NE in DSB überführt werden können. Die Autoren stützen ihre Vermutungen auf Daten von REGAN und SETLOW (1974) zum Reparaturverhalten menschlicher Zellen. Neuere Erkenntnisse (FRANCIS et al. 1981) deuten aber darauf hin, daß EMS, MMS und 4NQO "long patch Reparatur" bedingen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß sowohl Röntgenstrahlen und BLM ("short patch Reparatur") als auch EMS, MMS und 4NQO ("long patch Reparatur") positiv im NE-Test sind. Somit ist eine Einteilung von Mutagenen auf Grund der Reparaturtypen für die Bewertung im NE-Testsystem nicht möglich.

1.3. Einfluß von NE+V auf Mutagen induzierte Läsionen in G1

CHO-Zellen wurden in der G1-Phase des Zellzyklus mit den mono-, bi- und trifunktionellen alkylierenden Agenzien MMS, DEB und Trenimon behandelt. Die zusammengefaßten Ergebnisse sind in Tabelle 82 dargestellt. In der Tabelle wurden nur NE-Behandlungen mit der maximal wirksamen NE-Konzentration von 6-12 Einheiten berücksichtigt. Als Vergleich wurden Daten bestrahlter Zellen von NATARAJAN und OBE (1978) herangezogen.

Nachbehandlung mit NE+V führte in allen Versuchen zu einem Anstieg der Bruchrate. Ursache ist ein vermehrtes Auftreten sowohl von Chromatiden- als auch von Chromosomenaberrationen. Die Al-Frequenzen werden durch NE ebenfalls deutlich gesteigert. Somit kann vermutet werden, daß NE in der G1-Phase des Zellzyklus relativ unspezifisch auf verschiedene DNA-Läsionen einwirkt. Hauptsächlich könnten Basenschäden in SSB umgewandelt werden, die dann in der S-Phase des Zellzyklus

zu Chromatidenaberrationen führen würden. Aber auch einige Einzelstrangbrüche müssen für NE zugänglich sein, sie würden nach ihrer Transformation zu DSB eine Erhöhung der Chromosomenaberrationen bedingen. Diese Befunde stimmen prinzipiell mit den Ergebnissen an Lymphozyten überein (siehe unten).

Interessant ist, daß CHO-Zellen in G1 besonders empfindlich auf NE reagieren, das Wirkungsoptimum ist nur über einen kleinen Konzentrationsbereich gegeben. Niedrigere NE-Konzentrationen als 6-12 Einheiten haben keinen Einfluß mehr auf die Aberrationsrate, höhere schädigen die Zellen so stark, daß oft kein steigender Effekt mehr gefunden wurde.

TABELLE 82:

Testsubstanz	NE+V Behand- lung	maximale Mutagen- dosis	Aberra- tionstypen (5 %)	Ergebnis im NE- Test	Bruchrate in 100 Mitosen	Relative Bruchrate
Methylmethan- sulfonat	-	$1 \times 10^{-3} \text{ M}$	A1, B', RB' A1, B', B'', Dic/Ring, RB'	positiv	98	1,0
	+				209	2,1
Diepoxybutan	-	$1,3 \times 10^{-4} \text{ M}$	A1, B', RB' A1, B', B'', RB'	positiv	116	1,0
	+				409	3,5
Trenimon	-	$8,7 \times 10^{-9} \text{ M}$	A1, B', RB' A1, B', RB'	positiv	28	1,0
	+				61	2,2
Röntgen- strahlen*	-	200 R	B', B'', Dic/ Ring B', B'', RB', Dic/Ring	positiv	136	1,0
	+				310	2,0

* Daten nach Natarajan et al. (1980)

LYMPHOZYTEN

1. Entwicklung der Methode

1.1. Einfluß von NE auf Kontrollkulturen in G₀, G₁ und G₂

Die Methode zur Behandlung von CHO-Zellen mit NE wurde abgewandelt und auf menschliche Lymphozyten übertragen. Hierzu war es notwendig, eine NE-Konzentration zu ermitteln, die nicht cytotoxisch ist und nicht zu chromosomalen Aberrationen führt.

Menschliche Lymphozyten wurden vor der Stimulation (G₀), zur 20. (G₁) oder 45. (G₂) Kulturstunde mit verschiedenen NE-Konzentrationen behandelt. Zusätzlich zu den Aberrationen wurden Mitosefolgen und Mitoseindices zur Quantifizierung des Einflusses von NE auf die Proliferationskinetik bestimmt.

Behandlung von Lymphozyten mit 8-16 Einheiten NE zu den oben angegebenen Kulturzeiten (G₀, G₁, G₂) führte zu einer fast vollständigen Mitosehemmung bei einer Kulturdauer von 50 Stunden. Ursache ist eine stark zellzyklusverzögernde Wirkung von NE, was die Analyse von Mitosefolgen und Mitoseindices eindeutig belegt. Die NE-Nachbehandlung in allen weiteren Versuchen wurde mit einer NE-Konzentration von 4-8 Einheiten durchgeführt, um Zellzyklusverzögerungen möglichst gering zu halten.

NE-Behandlung in G₀, G₁ und G₂ hatte keinen Einfluß auf die Rate chromosomaler Aberrationen. Diese Ergebnisse sind die Voraussetzung für die unter 2.1. bis 2.5. beschriebenen kombinierten Mutagen+NE-Behandlungen.

In Anlehnung an die Arbeiten von NATARAJAN und OBE (1978) wurden die oben beschriebenen NE-Behandlungen für 15 Minuten in Eis und 15 Minuten bei 37 °C durchgeführt. Biochemische Untersuchungen von LINN und LEHMAN (1965a,b) zeigten, daß NE ein temperaturabhängiges Aktivitätsmaximum zwischen 47 °C und 62 °C hat. Deshalb wurden G₁- und G₂-Behandlungen mit NE bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Es zeigte sich, daß menschliche Lymphozyten empfindlich auf Temperaturen über 39 °C reagieren. Höhere Temperaturen während der Inkubation mit NE schädigten die Zellen so stark, daß keine Mitosen mehr gefunden wurden. Somit konnte das Temperaturoptimum der NE-Wirkung bei Lymphozyten nicht erreicht werden. Die verschiedenen Behandlungsbedingungen (15 Min. in Eis, 15 Min. bei 37 °C; 30 Min. bei 37 °C; 60 Min. bei 37 °C; 30 Min. bei 39 °C) blieben ohne deutlichen Einfluß auf die Aberrationsrate, eine signifikante

Erhöhung im Vergleich zu unbehandelten Kulturen konnte nicht gefunden werden. Behandlungszeiten von mehr als 60 Minuten erwiesen sich als problematisch. Während der Inkubation sind die Zellen ohne Kulturmedium, was zusätzliche Zellzyklusverzögerungen zur Folge hat. Die weiteren NE-Behandlungen wurden entweder für 15 Minuten in Eis und 15 Minuten bei 37 °C oder für 30 Minuten bei 37 °C durchgeführt.

1.2. Einfluß von NE auf Zellen in der S-Phase

Die oben beschriebenen Versuche ergaben, daß eine NE-Behandlung von Lymphozyten in G₀, G₁ und G₂ die Aberrationsrate nicht erhöht. Eine weitere Versuchsserie sollte klären, ob während der S-Phase einsträngige DNA-Regionen entstehen, die für NE zugänglich sind.

Die NE-Zugabe erfolgte von der 16. bis zur 45. Kulturstunde jeweils im Abstand von zwei Stunden. Nur bei Behandlung zur 34., 36., 37. und 39. Kulturstunde konnte ein deutlicher Unterschied in der Aberrationsrate zwischen Kontrollkulturen und NE-behandelten Kulturen gefunden werden. Die NE-Behandlung führte zu maximal 8% aberranten Mitosen. Diese Erhöhung der Aberrationsrate fällt zusammen mit der S-Phase des Zellzyklus. Somit müssen einige einsträngige DNA-Abschnitte während der S-Phase entstehen und durch NE in DSB und damit zu Chromatidenaberrationen umgewandelt werden.

BJURSELL et al. (1979) fanden, daß 1-2% der DNA in einsträngiger Form vorliegt. Untersuchungen an synchronisierten menschlichen Zellen ergaben, daß diese einsträngige DNA vorwiegend während der S-Phase nachweisbar ist (COLLINS 1977; COLLINS et al. 1977). Radioaktive Markierung zeigte, daß überwiegend DNA-Abschnitte, die noch nicht repliziert waren, einsträngig vorliegen (HENSON 1978).

Eine Möglichkeit die in dieser Arbeit gefundene Erhöhung der Bruchrate nach NE-Behandlung während der S-Phase zu erklären ist, daß NE einige dieser einsträngigen Regionen erkennt und Strangbrüche induziert, die dann zu Chromatidenaberrationen führen.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist, daß im Verlauf der Reparatur von Replikationsfehlern SSB entstehen, die dann von NE in DSB umgewandelt werden. Auch dieser Vorgang könnte die vermehrt auftretenden Chromatidenaberrationen nach NE-Behandlung während der S-Phase erklären.

1.3. Einfluß von NE auf die Zellkinetik

Zur Quantifizierung der zellzyklusverzögernden Wirkung von NE wurden 72 Stunden Kulturen zur 20. Kulturstunde mit NE und BUdR behandelt und die Mitosefolgen, sowie der daraus resultierende Proliferationsindex, bestimmt. Es wurde eine kontinuierliche Zunahme erster Mitosen mit steigender NE-Konzentration im Vergleich zu Kontrollkulturen gefunden, gleichzeitig ging die Anzahl zweiter und dritter Mitosen zurück. Diese NE-bedingte Zellzyklusverzögerung läßt sich durch den Proliferationsindex verdeutlichen, der bei Kontrollkulturen bei 161, in NE-behandelten Kulturen bei 107 liegt.

Auch der Mitoseindex wird bei einer Kulturdauer von 50 Stunden durch die NE-Behandlung in G1 deutlich verringert. In 72 Stunden Kulturen ist kaum noch ein Unterschied zu Kontrollkulturen festzustellen. Problematisch bleiben, im Hinblick auf kombinierte Mutagen+NE-Behandlungen, die toxischen Effekte von NE, die , abhängig von der Enzymaktivität, die durch eine Mutagenbehandlung bedingte Zellzyklusverzögerung noch verstärken.

1.4. Versuche zur Verbesserung der Permeabilität durch PEG, KCL und Viren

Eine weitere Schwierigkeit bei diesem Testsystem ist die Permeabilisierung der Zellen für die relativ großen NE-Moleküle. Ein permeabilisierendes Agens sollte die Aufnahmefähigkeit der Zellen für NE verbessern, ohne selbst Schäden an der DNA oder strukturelle Aberrationen in den Chromosomen zu induzieren. Auch synergistische Effekte mit den verwendeten Mutagenen sollten nicht eintreten.

OBE und NATARAJAN (1980) verwendeten Tween 80, PEG und inaktivierte Sendai Viren zur Verbesserung der Permeabilität von CHO-Zellen für NE. Sendai Viren erwiesen sich hierfür als besonders geeignet, ohne selbst strukturelle Aberrationen zu induzieren. PEG zeigte einen synergistischen Effekt mit Röntgenstrahlen, die Aberrationsrate lag deutlich über der nur bestrahlten Vergleichskultur. Behandlung mit PEG allein induzierte keine Aberrationen.

PEG findet Verwendung bei der Zellfusionierung. Die Induktion von Zellhybriden durch PEG wird auf Veränderungen an der Zellmembran zurück-

geführt (DAVIDSON und GERALD 1976).

Behandlung mit verschiedenen Dosen von PEG in der G2-Phase des Zellzyklus führte in Lymphozyten nicht zu einer Erhöhung der Aberrationsrate. Wurde die PEG-Behandlung dagegen nach einer Röntgenbestrahlung durchgeführt, lag die Aberrationsrate deutlich höher als in der bestrahlten Vergleichskultur. Niedrige PEG-Konzentrationen führten zu einem stärkeren Anstieg der Aberrationsrate als hohe PEG-Konzentrationen. Somit konnte der von OBE und NATARAJAN (1980) bei CHO-Zellen gefundene Effekt von PEG auf die Aberrationsrate röntgenbestrahlter Lymphozyten bestätigt werden.

Eine mögliche Erklärung ist, daß PEG Membranstrukturen angreift und als Folge davon Lysosomen zerstört werden, die ihrerseits Nucleasen freisetzen. Diese Nucleasen könnten mit Läsionen an der DNA, etwa Einzelstrangbrüchen, in Wechselwirkung treten und diese durch Umwandlung in Doppelstrangbrüche in Chromatidbrüche überführen.

Diese Erklärung wird durch Daten von ALLISON und PATON (1965) gestützt, die fanden, daß eine Schädigung der Lysosomen zu einer gesteigerten Rate struktureller Aberrationen in menschlichen Fibroblasten führt.

Wegen des synergistischen Effektes von PEG und Röntgenstrahlen auf die Aberrationsrate in CHO-Zellen und Lymphozyten wurde PEG nicht als permeabilisierendes Agens im NE-Testsystem verwendet.

Inaktivierte Sendai Viren haben offenbar eine permeabilisierende Wirkung auf Lymphozyten. Dieser Effekt konnte aber nicht quantifiziert werden und wurde nicht in allen Experimenten gefunden. In der Mehrzahl der Versuche führte NE-Behandlung auch ohne eine zusätzliche Behandlung mit Viren zu einer Steigerung der Aberrationsrate. Somit sollten Lymphozyten nur mit NE und nicht noch zusätzlich mit Viren nachbehandelt werden.

Ein Problem für NE-Experimente sind unstimulierte G0-Lymphozyten. Es wurde versucht, die Zellen durch eine hypotone KCL-Behandlung zu vergrößern und somit die Permeabilität der Lymphozyten für NE zu erhöhen. Auch in diesen Experimenten konnte keine Verbesserung der Permeabilität für NE nachgewiesen werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß alle durchgeführten Versuche zur Verbesserung der Permeabilität für NE unbefriedigend waren. Lymphozyten wurden deshalb nur mit NE nachbehandelt.

2. Anwendung der Methode

2.1. Einfluß von NE auf Mutagen induzierte Läsionen in GO

GO-Behandlungen wurden mit Röntgenstrahlen und BLM durchgeführt. Zuerst werden die Ergebnisse der Strahlenversuche diskutiert. Im Institut für Genetik (Berlin) wurden zwei Versuche durchgeführt. In beiden Versuchen wurde ein leichter Anstieg der Chromosomenaberrationen durch die Nachbehandlung mit NE induziert. Der Anstieg liegt in beiden Versuchen klar unterhalb der Verdopplung der Bruchrate. Wegen eines Defektes am Dosimeter konnte die Strahlendosis nicht exakt bestimmt werden. Die Bruchraten zeigen aber, daß die Bestrahlungen mit ungefähr 50 R erfolgten.

Weitere Versuche wurden mit einer intakten Röntgenröhre im Department of Radiation Genetics and Chemical Mutagenesis (Leiden) durchgeführt. Acht Versuche mit unterschiedlichen Bestrahlungsdosen (50-300 R) erbrachten alle ähnliche Ergebnisse: NE-Behandlung nach der Bestrahlung ergab für alle Strahlendosen und NE-Konzentrationen weder Mitosen noch stimulierte Zellen. In bestrahlten Zellen, die nicht mit NE nachbehandelt waren, entsprach der Mitoseindex und die Aberrationsrate den Erwartungen.

Folgende Erklärungsmöglichkeiten kommen für die in Leiden durchgeführten Versuche in Frage: Eine verminderte Reparaturfähigkeit von GO-Lymphozyten für NE-induzierte DSB. Allerdings wurden Reparaturvorgänge in GO-Lymphozyten von OBE et al. (1982) beschrieben, somit ist diese Möglichkeit unwahrscheinlich.

Auch ein Zusammenhang mit der Stimulation durch PHA ist nicht auszuschließen.

Es konnte nicht geklärt werden, ob eine der genannten Möglichkeiten zutrifft oder ob dem Effekt ein anderer Mechanismus zu Grunde liegt. Diese große Empfindlichkeit gegenüber NE wurde nur nach einer Röntgenbestrahlung in GO gefunden.

Die Berliner Daten werden dahingehend gedeutet, daß die NE-Aktivität der verwendeten Charge stark herabgesetzt war. Die Restaktivität könnte Ursache der leicht erhöhten Aberrationsrate sein. Durch diese Aktivitätsverminderung ließe sich auch das Fehlen der toxischen Effekte bei den Berliner Versuchen erklären. Die GO-Ergebnisse können in jedem Fall nur unvollständig erklärt werden und bedürfen weiterer Experimente. Sinnvoll wären NE-Behandlungen nach sehr niedrigen Bestrahlungsdosen (<50 R) und weiter reduzierte NE-Konzentrationen ($<2-4$ Einheiten). Ferner sollten Bestrahlungen und NE-Behandlungen sofort nach der Stimulation mit PHA und in der frühen G1-Phase durchgeführt werden. Diese Versuche könnten klären, inwieweit die gefundene Sensitivität bestrahlter GO-Lymphozyten gegenüber NE in einem Zusammenhang mit der Stimulation steht.

BLM Behandlung in GO und NE-Nachbehandlung erbrachte ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse. Von den vier durchgeführten Versuchen wurde zweimal eine Erhöhung der Aberrationsrate durch NE gefunden, zwei Versuche waren negativ. NE steigerte sowohl die Chromatiden- als auch die Chromosomenaberrationen. Die vermehrt auftretenden Chromosomenaberrationen haben ihre Ursache wahrscheinlich in einer NE-bedingten Umwandlung von BLM induzierten SSB in DSB. Das Ansteigen der Chromatidenaberrationen durch die Nachbehandlung mit NE kann durch die NE-bedingte Umwandlung von Basenschäden in SSB erklärt werden. In beiden Versuchen wurde die Bruchrate durch NE verdreifacht. Diese positiven Effekte zeigen, daß es prinzipiell möglich ist, BLM induzierte Läsionen durch NE-Zugabe in GO zu beeinflussen. Die negativen Ergebnisse haben ihre Ursache wahrscheinlich im Aktivitätsverlust des Enzyms.

Hier zeigt sich möglicherweise ein Problem dieses cytologischen Testsystems. Die NE-Aktivität unterliegt offenbar großen Schwankungen, was zu einer Verfälschung der Ergebnisse beitragen kann. Zur Vermeidung von Fehlern dieser Art sollte entweder eine biochemische Aktivitätsprüfung durchgeführt werden, oder aber ein Referenzmutagen wie etwa Röntgenstrahlen als Positivkontrolle verwendet werden.

2.2. Einfluß von NE auf Mutagen induzierte Läsionen in G1

Röntgenbestrahlung und Nachbehandlung mit NE erhöhte die Aberrationsrate im Vergleich zu den bestrahlten Vergleichskulturen signifikant. Dieser Anstieg der Bruchrate beruht auf einem vermehrten Auftreten von Chromosomenaberrationen (B'', Dic/Ring), Chromatidenaberrationen kamen nach der NE-Behandlung nicht vermehrt vor.

Röntgenstrahlen induzieren hauptsächlich SSB, die durch NE in DSB überführt werden. Die Behandlung mit Röntgenstrahlen und NE erfolgte vor der S-Phase, woraus in der nächsten Mitose vermehrt Chromosomenaberrationen resultieren. Der fehlende Einfluß von NE auf die Rate der Chromatidenaberrationen kann dadurch erklärt werden, daß NE strahleninduzierte BD nicht erkennt und deshalb keine Strangbrüche entstehen, oder daß Strangbrüche aber vor der S-Phase bereits repariert werden.

BLM Behandlung und Nachbehandlung mit NE in der G1-Phase des Zellzyklus erbrachte in allen drei Versuchen keine Beeinflussung der Aberrationsrate durch das Enzym. Dieses Ergebnis ist völlig unerwartet und kann nicht erklärt werden. Auffallend ist die große Schwankungsbreite der Ergebnisse. Es scheint, daß minimale Unregelmäßigkeiten in den Kulturbedingungen (Temperatur, Behandlungsdauer, Alter der BLM Stammlösung) zu einer stark unterschiedlichen mutagenen Wirkung führten. Der fehlende NE-Effekt kann nicht nur mit einer verminderten Enzymaktivität erklärt werden, da die Experimente in großen zeitlichen Abständen mit unterschiedlichen NE-Chargen durchgeführt wurden.

Die Ergebnisse der Experimente mit den alkylierenden Agenzien MMS, DEB und Trenimon werden zusammen diskutiert. MMS ist monofunktionell, DEB bifunktionell und Trenimon trifunktionell alkylierend.

MMS induziert in Lymphozyten nur wenige strukturelle Aberrationen, Dosen unterhalb der cytotoxischen Grenze führen maximal zu 10% aberranten Mitosen. Es wurden vier Versuche mit unterschiedlichen Behandlungsbedingungen durchgeführt. In einem Versuch konnte die Aberrationsrate durch die Nachbehandlung mit NE deutlich gesteigert werden, in einem zweiten war nur ein schwacher Einfluß nachweisbar, in zwei weiteren wurde kein Einfluß gefunden. Die negativen Ergebnisse stammen aus Versuchen, in denen MMS weniger als 5% aberrante Mitosen indu-

zierte. Es konnte nicht geklärt werden, ob die NE-Wirkung einen Schwellenwert hat, oder ob bei der Auswertung einer genügend großen Anzahl von Mitosen eine signifikante Steigerung nachweisbar gewesen wäre. Wurden die Aberrationsraten durch NE gesteigert, beruhte dies immer auf einem, wenn auch geringen, Anstieg aller Aberrationstypen (B',B'', RB',Dic/Ring). Somit kann man davon ausgehen, daß das Enzym sowohl SSB in DSB überführt, was zu dem Anstieg der Chromosomenaberrationen führt, als auch einige durch MMS induzierte Basenschäden erkennt und sie in SSB überführt, was dann vermehrt zu Chromatidenaberrationen führt.

DEB Behandlung in G1 führt zu hohen Aberrationsraten. Bei niedrigen und mittleren DEB Dosen steigert die NE-Behandlung hauptsächlich die Rate der B' und RB'. Bei Behandlung mit hohen DEB Dosen steigert NE zusätzlich noch die Rate der B''. In allen Kulturen, die in G1 mit DEB behandelt wurden, lag eine besonders deutliche Steigerung der Bruchraten nach der NE-Behandlung vor.

Trenimonbehandlung und Nachbehandlung mit NE in G1 steigert die Rate der B' und B''. Bei diesen Versuchen wurde an der Grenze der Nachweisbarkeit des NE-Effektes gearbeitet. Trenimon induzierte in den getesteten Konzentrationen eine Bruchrate von 2,3 in 100 Mitosen, dieser Wert liegt nur geringfügig über dem entsprechenden aus Kontrollkulturen. Nach der Behandlung mit NE wurde eine Bruchrate von 8,7 gefunden, was bei der großen Anzahl ausgewerteter Mitosen eine signifikante Steigerung darstellt. In der Mehrzahl der bisher durchgeführten Versuche sprachen die Ergebnisse dafür, daß die Behandlung mit NE erst wirksam wird, wenn von dem verwendeten Mutagen etwa 10% aberrante Mitosen induziert wurden. Die Ergebnisse mit Trenimonbehandelten G1-Zellen zeigen deutlich, daß ein solcher Schwellenwert der NE-Wirkung nicht existiert.

Beim Vergleich der Ergebnisse mit MMS einerseits und mit DEB und Trenimon andererseits, ergeben sich wesentliche Unterschiede: Behandlung mit MMS (monofunktionell alkylierend) induziert SSB, die durch NE in DSB transformiert werden, was zu Chromosomenaberrationen führt. Zusätzlich erkennt NE einige BD, die in SSB überführt werden und in der nächsten Mitose eine erhöhte Rate an Chromatidenaberrationen

bedingen.

Behandlung mit DEB und Trenimon (polyfunktionell alkylierend) induziert direkt keine SSB, sondern überwiegend cross-links. Diese cross-links werden von NE wahrscheinlich als Konformationsänderungen der DNA erkannt. An diesen Stellen induziert NE dann Einzelstrangbrüche, die in der nächsten Mitose zu Chromatidenaberrationen führen. Vermehrt auftretende B'' nach hohen DEB Dosen und Nachbehandlung mit NE werden als Isochromatidbrüche interpretiert. Diese Erklärung wird gestützt durch das Fehlen von dizentrischen Chromosomen und Ringchromosomen.

Eine Behandlung mit Acetaldehyd und Formaldehyd allein induziert keine Aberrationen nach Zugabe in G1, auch eine Nachbehandlung mit NE hat keinen Einfluß. Dieses Ergebnis wird dahingehend gedeutet, daß Acetaldehyd und Formaldehyd direkt keine SSB induzieren und somit kein Substrat für NE gegeben ist.

Bei Behandlung von isolierter DNA mit Acetaldehyd wurden cross-links nachgewiesen (RISTOW und OBE 1978). Es wird aber angenommen, daß Acetaldehyd und Formaldehyd, im Gegensatz zu DEB und Trenimon, in der Zelle nur wenige cross-links induzieren, die von NE nicht in SSB transformiert werden können.

2.3. Einfluß von NE auf Mutagen induzierte Läsionen in G2

In Zellen die in der G2-Phase des Zellzyklus mit Röntgenstrahlen oder BLM behandelt wurden, erhöhte NE-Nachbehandlung die Rate der achromatischen Läsionen und der Chromatidbrüche. Als Ursache für die vermehrt auftretenden Chromatidbrüche wird eine NE-bedingte Umwandlung von SSB in DSB vermutet. Die vermehrt auftretenden achromatischen Läsionen könnten ihre Ursache in nicht reparierten SSB haben. Entstehen könnten diese SSB durch eine Umwandlung von Basenschäden durch NE. Die positiven Ergebnisse sind hochsignifikant, die NE-Nachbehandlung führte mindestens zu einer Verdopplung der Bruchrate. In einigen Experimenten wurden die Zellen bei 39 °C mit BLM behandelt. Hierbei wurden erheblich höhere Aberrationsraten induziert als durch die Behandlung bei 37 °C. Diese Ergebnisse zeigen deutlich wie empfind-

lich die Lymphozyten auf minimale Temperaturveränderungen während der BLM Behandlung reagieren.

Behandlung von Zellen in G2 mit MMS oder DEB führte zu Aberrationsraten im Kontrollbereich, auch eine Nachbehandlung mit NE hatte keinen steigenden Einfluß.

Das negative Ergebnis mit MMS ist unerwartet, denn es ist bekannt, daß MMS Einzelstrangbrüche induziert (VOGEL und NATARAJAN 1982). Ferner konnten NATARAJAN und OBE (1978) zeigen, daß in MMS behandelten CHO-Zellen eine Nachbehandlung mit NE in G2 zu einem deutlichen Anstieg der Aberrationsrate führt. Es kann vermutet werden, daß MMS in Lymphozyten nur wenige Läsionen induziert und somit der Nachweis eines NE-Effektes erschwert ist. Diese Vermutung wird durch die oben diskutierten G1-Ergebnisse gestützt. Auch in G1 war die Beeinflussung der Aberrationsrate durch NE nur gering, was wiederum dafür spricht, daß nur wenige Läsionen für NE zugänglich sind.

Die DEB Ergebnisse wurden erwartet, DEB induziert keine SSB, sondern cross-links, somit ist für NE kein Substrat gegeben. Dieser Befund kann indirekt wiederum durch die G1-Daten gestützt werden. Nach der G1-Behandlung mit DEB und NE war in erster Linie die Rate der Chromatidenaberrationen gesteigert, was darauf schließen läßt, daß NE überwiegend DEB induzierte Konformationsänderungen erkennt und in SSB überführt.

In einigen Experimenten wurden Lymphozyten zu unterschiedlichen Zeiten der G2-Phase mit Trenimon und NE behandelt. Durch unterschiedliche Behandlungszeiten mit Trenimon und Colcemid konnten selektiv Zellen der frühen oder späten G2-Phase behandelt werden. In den drei durchgeführten Experimenten lagen zwischen dem Behandlungsbeginn mit Trenimon und der Fixierung 3,5 ; 5,0 oder 6,0 Stunden.

Behandlung in der späten G2-Phase (Behandlungsbeginn 3,5 Stunden vor der Fixierung) mit Trenimon hatte nur wenige strukturelle Aberrationen zur Folge, die Nachbehandlung mit NE war wirkungslos. Als Ursache wird angenommen, daß die Chromosomen schon zu weit aufgefältelt sind und so das Enzym nicht mehr an der DNA wirken kann.

Bei einem Zeitraum von 5 Stunden zwischen Trenimonbehandlung und

Fixierung wurden durch Trenimon maximal 10% aberrante Mitosen induziert, die Nachbehandlung mit NE führte zu einer Verdopplung dieser Rate. Somit müssen noch einige DNA-Bereiche, die SSB enthalten, für NE zugänglich sein. Die NE-bedingte Transformation dieser SSB in DSB ist die Ursache der vermehrt gefundenen Chromatidenaberrationen.

Bei einem Zeitraum von 6 Stunden zwischen der Trenimonbehandlung und Fixierung induzierte Trenimon allein schon hohe Aberrationsraten (bis 36%). Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß Zellen in der späten S-Phase behandelt wurden. Die NE-Behandlung führte mindestens zu einer Verdopplung, teilweise zu einer Verdreifachung der Bruchrate.

Eine Deutungsmöglichkeit für diese Ergebnisse ist, daß Reparaturvorgänge in diesen Zellen zu vielen SSB führen, die von NE in DSB und somit zu Chromatidenaberrationen umgewandelt werden. Trenimon führt direkt nicht zu SSB, es bildet hauptsächlich cross-links mit der DNA (OBE und BBEK 1979).

2.4. Einfluß von NE auf die Aberrationsrate zu verschiedenen Zeiten nach der Mutagenbehandlung

In den bisher beschriebenen Versuchen wurde die NE-Behandlung entweder gleichzeitig mit der Mutagenbehandlung oder sofort danach durchgeführt. Die folgenden Analysen sollten klären, ob NE nur unmittelbar nach der Mutagenbehandlung die Aberrationsrate steigert, oder ob diese Beeinflussung auch noch längere Zeit danach möglich ist.

NATARAJAN et al. (1980) bestrahlten CHO-Zellen in G2 und führten nach unterschiedlichen Erholungszeiten NE-Nachbehandlungen durch. Die Autoren fanden sowohl nach kurzen als auch nach längeren Erholungszeiten eine NE-bedingte Verdreifachung der Bruchrate. Die Rate der Austauschaberrationen (RB') war nach kurzen Erholungszeiten erheblich höher als nach langen Erholungszeiten.

Die Autoren deuten ihre Ergebnisse dahingehend, daß noch längere Zeit nach der Bestrahlung SSB vorhanden sind und durch NE in DSB überführt werden können. Die fortschreitende Kondensation der Chromsomen vor der Mitose führt aber dazu, daß diese Brüche nicht mehr miteinander in Wechselwirkung treten und Austauschaberrationen bilden können.

In dieser Arbeit wurden Lymphozyten in der G2-Phase des Zellzyklus bestrahlt und zu verschiedenen Zeiten nach der Bestrahlung mit NE nachbehandelt. Die sofortige Nachbehandlung verdreifachte die Bruchrate, lagen 30 oder 60 Minuten zwischen Bestrahlung und NE-Nachbehandlung, war die Bruchrate annähernd versechsfacht. Die Verdreifachung der Bruchrate durch die sofortige Nachbehandlung wird erklärt durch die NE-bedingte Umwandlung von direkt induzierten Einzelstrangbrüchen in Doppelstrangbrüche. Die weitere Steigerung der Bruchrate bei später erfolgender NE-Behandlung (30 oder 60 Minuten nach der Bestrahlung) läßt sich durch reparaturbedingte, zusätzlich entstandene, SSB erklären, die ebenfalls der NE-Wirkung unterliegen.

Chromatidentranslokationen wurden in den Experimenten dieser Arbeit nur wenige gefunden, unabhängig davon, ob die NE-Nachbehandlung sofort oder 60 Minuten nach der Bestrahlung erfolgte.

Die unterschiedlichen Ergebnisse bei Behandlung von CHO-Zellen und menschlichen Lymphozyten könnten darauf beruhen, daß CHO-Zellen eine verminderte Reparaturkapazität haben (NATARAJAN und OBE 1978). Einzelstrangbrüche könnten so längere Zeit nach der Bestrahlung offen bleiben, außerdem würden nur wenige SSB zusätzlich durch Reparaturvorgänge entstehen. Diese Annahme könnte die gleichbleibende Aberrationsrate nach sofortiger und später erfolgender Behandlung mit NE bei CHO-Zellen erklären.

NATARAJAN et al. (1980) diskutieren ein Modell zur Entstehung chromosomaler Aberrationen nach einer G2-Röntgenbestrahlung bei CHO-Zellen (Tab.83).

In Tabelle 84 wird ein entsprechendes Modell zur Entstehung chromosomaler Aberrationen nach Röntgenbestrahlung bei Lymphozyten, basierend auf den Daten dieser Arbeit, entwickelt.

TABELLE 83: CHO-Zellen (nach NATARAJAN et al. 1980)

EARLY G2

Uncondensed chromatids with many contact points between and within chromosomes

LATE G2/EARLY PROPHASE

Condensed chromatids contact points between chromosomes lost				
X-irradiation: induction of DNA base damage, single strand breaks (SSB), double strand breaks (DSB)				
X-irradiation: induction of DNA base damage, single strand breaks (SSB), double strand breaks (DSB)				

TABELLE 84: Lymphozyten

X-irradiation: induction of DNA base damage, single strand breaks (SSB), double strand breaks (DSB)				
X-irradiation: induction of DNA base damage, single strand breaks (SSB), double strand breaks (DSB)				

Ähnlich gestaffelte NE-Nachbehandlungen wurden nach MMS und DEB Behandlung in der G1-Phase des Zellzyklus durchgeführt. Die NE-Zugabe erfolgte bis zu 5 Stunden nach der Mutagenbehandlung.

MMS Behandlung allein steigerte die Aberrationsrate nicht. Auch eine NE-Nachbehandlung sofort oder 5 Stunden nach der MMS-Behandlung hatte keine erhöhte Aberrationsrate zur Folge. Auffallend war nur eine zunehmend toxische Wirkung von NE, je länger die Erholungszeit zwischen MMS Behandlung und NE-Nachbehandlung war.

DEB Behandlung in G1 führt zu hohen Bruchraten, die durch eine unmittelbar danach durchgeführte Behandlung mit NE verdreifacht werden konnte. NE-Behandlung 30 oder 60 Minuten nach der DEB Behandlung führte nur noch zu einer knappen Verdopplung der Bruchrate, nach 120 Minuten wurde wieder eine Verdreifachung gefunden. Das Absinken der Bruchrate nach 30 und 60 Minuten ist unklar, möglicherweise sind kulturbedingte Artefakte die Ursache. Die Ergebnisse können aber auch dahingehend gedeutet werden, daß einige DEB induzierte Läsionen auch 2 Stunden nach der Behandlung noch nicht vollständig repariert und für NE zugänglich sind. Als Läsionstyp kommen Basenschäden in Frage, die durch NE in SSB umgewandelt werden könnten, was in der nächsten Mitose eine erhöhte Rate an Chromatidenaberrationen zur Folge hätte.

2.5. Achromatische Läsionen und ihre Bedeutung im NE-Testsystem

Nichtfärbbare Lücken in den Chromatiden werden als achromatische Läsionen (Al) bezeichnet. Bei der routinemäßigen cytologischen Auswertung werden Lücken, die eine Chromatidenbreite überschreiten als Chromatidbrüche gewertet. Obwohl bei vielen cytologischen Studien Al ausgewertet werden, wird ihnen häufig keine Bedeutung als Mutationsäquivalent zugemessen. Eine Ursache dafür ist, daß die Abgrenzung gegenüber Chromatidbrüchen nicht eindeutig ist. Ferner konnte noch immer nicht geklärt werden, ob Al einen genetischen Schaden darstellen oder nicht. Die Beobachtung, daß cytologisch als Al klassifizierte Läsionen in der Mehrzahl der Fälle nicht zu Anaphase-Fragmenten führen, spricht dafür, daß Al wahrscheinlich keine offenen Brüche sind.

Die Al Häufigkeiten sind abhängig vom Kulturmedium, Medium 199 führt

zu mehr A1 als Ham's F10. Zudem können die A1 Häufigkeiten im Verlauf mehrerer Experimente bei ein und demselben Blutspender schwanken.

A1 können sowohl durch ionisierende Strahlen und UV, als auch durch Chemikalien und Viren vermehrt induziert werden. Neben den genannten Substanzen, die hauptsächlich die DNA schädigen, führt auch Behandlung mit Mercaptoäthanol vermehrt zu A1. Mercaptoäthanol greift die chromosomalen Proteine an und induziert keine erhöhte Rate struktureller Aberrationen (BRØGGER 1975)

SCHEID und TRAUT (1971) konnten A1 nicht nur durch DNA spezifische Färbetechniken, sondern auch durch Anfärben der Proteine sichtbar machen.

Ergebnisse aus der Elektronen- und UV-Mikroskopie lassen den Schluß zu, daß A1 entweder auf einem Verlust von Chromosomenmaterial oder auf einer lokalen Störung der Kondensation beruhen (SCHEID und TRAUT 1970, 1971a,b). Chromatin Brücken wurden als Folge von A1 und B' gefunden, allerdings konnten sie bei beiden Aberrationstypen auch ausbleiben. In Metaphasen sind derartige Unterschiede nicht feststellbar, was einen gewissen Prozentsatz von Fehlentscheidungen auf Grund des cytologischen Bildes zur Folge hat. BRECHER (1977) interpretiert A1 deshalb als unvollständige Chromatidbrüche.

HITTELMAN und RAO (1974) postulieren, daß mindestens zwei verschiedene Arten von A1 existieren: (a) Infolge von DNA-Einzelstrangbrüchen oder einsträngigen DNA-Regionen ist die erste Phase der Chromatinkondensation gestört. (b) Eine veränderte DNA-Protein Bindung führt in einem späteren Stadium zu Kondensationsfehlern.

BENDER et al. (1974) glauben, daß unreparierte DNA-Einzelstrangbrüche die Ursache von A1 sind. Auch NATARAJAN und OBE (1978) kamen auf Grund der Daten mit dem NE-Testsystem zu derselben Schlußfolgerung.

DIMITROV (1981) behauptet, daß A1 nach Behandlung mit Röntgenstrahlen, alkylierenden Agenzien und UV-Licht ihre Ursache in Einzelstrangbrüchen haben. Alkylierende Agenzien induzieren noch zusätzlich A1, die auf einer Veränderung der DNA-Protein -Bindung beruhen. Die genannten Ausführungen machen deutlich, wie schwierig die eindeutige Beurteilung von A1 im cytologischen Test ist.

BRØGGER (1982) schlägt folgende Möglichkeiten zur Bewertung von A1 und B' vor: A1 und B' sollten entweder zu einem Aberrationstyp zusammengefaßt

werden, oder A1 und B' sollten nicht ausgewertet werden. Die erste Möglichkeit hätte den Vorteil, daß Fehlentscheidungen auf Grund von subjektiven Beurteilungskriterien wegfallen. A1 und B' gar nicht auszuwerten beinhaltet einen erheblichen Informationsverlust.

In der vorliegenden Arbeit wurden A1 und B', getrennt nach den üblichen Kriterien, ausgewertet. A1 wurden nicht in die Anzahl aberranter Mitosen und die Bruchrate einbezogen. Es wurden auffällige Zusammenhänge mit der NE-Behandlung gefunden, die im Folgenden diskutiert werden. In Tabelle 85 wurden die Daten aller Experimente zusammengefaßt. An Hand der höchsten getesteten Mutagenkonzentration werden A1 Häufigkeiten nach Mutagenbehandlung allein mit A1 Häufigkeiten nach Mutagen+NE-Behandlung verglichen. Außerdem wird die Anzahl der Chromatidbrüche in Mutagen behandelten Kulturen mit denen in Mutagen+NE-behandelten Kulturen verglichen.

A1- und B'-Frequenzen lassen sich in gleicher Weise durch die NE-Behandlung beeinflussen. Erhöht die NE-Behandlung die Rate der A1, wird gleichzeitig auch die Rate der B' erhöht. Bleibt durch die NE-Behandlung die Rate der A1 unverändert, wird auch die Rate der B' nicht beeinflusst.

Davon abweichende Ergebnisse fanden NATARAJAN und OBE (1978). Bei Behandlung von CHO-Zellen mit UV und Mitomycin C in G2 führte die Nachbehandlung mit NE+V zu einem deutlichen Anstieg der A1 Frequenzen während die Rate der Chromatidbrüche unbeeinflusst blieb. Ursache der vermehrt auftretenden A1 könnten Basenschäden sein, die in der G2-Phase des Zellzyklus durch NE in SSB überführt wurden und in der Metaphase als A1 sichtbar werden.

Die von Bender, Natarajan und Obe geforderten Einzelstrangbrüche als Ursache von A1 können nur einen Teil der in dieser Arbeit erhaltenen Daten erklären.

In G2 röntgenbestrahlten, Trenimon- und BLM behandelten Kulturen führte Nachbehandlung mit NE zu einem Anstieg der A1 Rate. Dieser Anstieg könnte auf einer NE-bedingten Umwandlung von BD in SSB beruhen.

In G1 mit Trenimon, DEB oder MMS behandelten Kulturen und in G0 mit BLM behandelten Kulturen führte NE-Nachbehandlung ebenfalls zu einem Anstieg

der A1 Rate. Die Behandlung erfolgte in G1, wobei durch NE induzierte SSB eine S-Phase durchlaufen müßten. Zu erwarten wäre, daß diese SSB in der S-Phase in DSB überführt werden, woraus Chromatidenaberrationen in der darauffolgenden Mitose resultieren würden. Unwahrscheinlich ist, daß in G1 induzierte SSB nach der S-Phase noch unverändert vorliegen und sich als A1 in der Mitose manifestieren.

TABELLE 85:

Testsubstanz (maximale Dosis)	A1 in 100 Mi- tosen nach Mu- tagenbehand- lung	A1 in 100 Mi- tosen nach Mu- tagen+NE-BE- handlung	B' in 100 Mi- tosen nach Mutagenbe- handlung	B' in 100 Mi- tosen nach Mu- tagen+NE-BE- handlung	NE-Effekt auf A1	
Röntgen G1 (200 R)	3	6	3	4	-	-
Röntgen G2 (120 R)	58	126	71	117	+	+
BLM G0 (50µg/ml)	5	9	7	19	+	+
BLM G2 (150µg/ml)	40	80	70	147	+	+
MMS G1 (10^{-4} M)	5	12	5	10	+	+
MMS G2 (10^{-3} M)	7	8	4	3	-	-
DEB G1 ($2,6 \times 10^{-5}$ M)	9	22	14	41	+	+
DEB G2 ($1,3 \times 10^{-4}$ M)	5	7	2	2	-	-
Trenimon G1 (5×10^{-6} M)	4	9	2	7	+	+
Trenimon G2 (1×10^{-6} M)	17	53	47	124	+	+
Acetaldehyd G1 (3×10^{-5} M)	7	2	1	2	-	-
Formaldehyd (1×10^{-5} M)	4	4	2	2	-	-

EINFLUSS VON NE AUF DIE SCE-RATE IN CHO-ZELLEN UND LYMPHOZYTEN

Chromosomale Aberrationen und SCE sind zwei verschiedene cytogenetische Endpunkte, beide sind ein Maß der DNA-Schädigung nach einer Mutagenbehandlung. Über den Zusammenhang von chromosomalen Aberrationen und SCE existieren zwei grundsätzlich verschiedene Auffassungen:

- (1) Läsionen, die zu SCE führen, sind andere als die, die chromosomale Aberrationen verursachen.
- (2) SCE und chromosomale Aberrationen haben die gleichen Primärläsionen als Ursache.

Aus der Übersichtsarbeit von NATARAJAN (1982) werden im Folgenden für beide Hypothesen Beweise aufgeführt. Anschließend werden die Ergebnisse im Zusammenhang mit dem NE-System diskutiert.

- Zu (1): - Ionisierende Strahlen induzieren nur wenige SCEs, sind aber sehr effektive Induktoren von strukturellen Aberrationen.
- Nachbehandlung mit Koffein nach einer vorherigen Behandlung mit alkylierenden Agenzien führt zu erhöhten Aberrationsraten, die SCE-Rate steigt nicht oder nur geringfügig an.
 - Zellen von Patienten mit Fanconi Anämie und Ataxia telangiectasia zeigen spontan erhöhte Raten chromosomaler Aberrationen, die SCE-Rate ist nicht erhöht.
 - SCEs und Chromatidbrüche entstehen an unabhängigen Loci in den Chromosomen.
- Zu (2): - SCE und chromosomale Aberrationen werden beide durch Pyrimidin-Dimere verursacht.
- Photoreaktivierung reduziert strukturelle Aberrationen und SCEs.
- Zellen von Patienten mit Bloom's Syndrom zeigen spontan erhöhte Raten chromosomaler Aberrationen und SCEs.

In dieser Arbeit wurden CHO-Zellen und menschliche Lymphozyten in der G1-Phase des Zellzyklus mit den Mutagenen DEB und Trenimon behandelt und mit NE nachbehandelt. Die SCE-Raten unterschieden sich nicht in Mutagen und Mutagen+NE behandelten Kulturen.

Eine Auswertung auf strukturelle Aberrationen wurde durchgeführt, wenn die Mutagenkonzentration eine sinnvolle Auswertung ermöglichte. NE-Behandlung hatte immer eine deutliche Steigerung der Rate chromosomaler

Aberrationen zur Folge. Man kann davon ausgehen, daß die Behandlung mit NE zusätzliche Läsionen in der DNA induziert, die in der ersten Mitose nach der Behandlung vermehrt zu Chromatidenaberrationen führen. In den zweiten Mitosen nach der Behandlung ist die SCE-Rate nicht erhöht. Die fehlende Beeinflussung der SCE-Rate durch NE ist nicht unerwartet, denn durch das Enzym werden vermehrt Strangbrüche induziert, die wahrscheinlich nicht an der SCE-Entstehung beteiligt sind (WOLFF 1978). Über die an der SCE-Entstehung beteiligten Läsionen kann mit diesem Testsystem keine Aussage gemacht werden, die Ergebnisse können nur dahingehend interpretiert werden, daß SCEs und chromosomale Aberrationen wahrscheinlich aus unterschiedlichen Läsionen in der DNA hervorgehen. In der folgenden Übersicht wurden die Ergebnisse dieser Arbeit in Zusammenhang mit Daten aus der Literatur gebracht. Der Einfluß verschiedener Behandlungsarten und Testsysteme auf chromosomale Aberrationen und SCEs wurde in drei Klassen eingeteilt: (1) Nur die SCE-Rate ist erhöht, (2) SCE- und Aberrationsrate sind erhöht und (3) nur die Aberrationsrate ist erhöht.

Die Zusammenstellung zeigt, daß einige Läsionen nur zu strukturellen Aberrationen führen, andere führen zu SCEs und Aberrationen und ein dritter Typ von Läsionen führt wahrscheinlich nur zu SCEs.

<u>nur</u> die SCE-Rate ist erhöht	SCE- <u>und</u> Aberrations- rate sind erhöht	<u>nur</u> die Aberrations- rate ist erhöht
3-Aminobenzamid [*]	UV-Licht	NE-System
	Bloom's Syndrom	Röntgenstrahlen
	Alkylierende	Bleomycin
	Agenzien	Fanconi Anämie
		Ataxia telangiectasia

^{*} NATARAJAN et al. (1981)

BEWERTUNG DER ERGEBNISSE

1.1. Kritische Bewertung des Testsystems

Im Anschluß an die Diskussion der einzelnen Ergebnisse sollen einige problematische Aspekte sowie widersprüchliche Ergebnisse dieses Testsystems zusammengefaßt werden:

- NE-Nachbehandlung führt in Wiederholungsexperimenten oft zu einer unterschiedlich starken Beeinflußung der Aberrationsraten. Ursache könnten Aktivitätsschwankungen von NE sein. Für weitere Untersuchungen erscheint eine gleichzeitige biochemische Aktivitätsprüfung sinnvoll, um falsch negative Ergebnisse auszuschließen. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Positivkontrolle (Röntgenstrahlen) mitlaufen zu lassen.
- Die Spezifität von NE gegenüber Schäden an der DNA scheint nicht auf Einzelstrangbrüche beschränkt zu sein, NE erkennt offenbar auch Konformationsänderungen der DNA. Diese Vermutung wird gestützt durch die G1-Ergebnisse mit MMS, DEB und Trenimon.
- Toxische und zellzyklusverzögernde Wirkungen von NE sind abhängig von der Aktivität des Enzyms. Wie schon angeführt, unterliegt die Enzymaktivität gewissen Schwankungen, daraus ergeben sich Schwierigkeiten in der Wahl von geeigneten NE-Konzentrationen und Kulturzeiten.
- Ein weiteres Problem ist die NE-Wirkung bei Mutagen induzierten Aberrationsraten, die unter 5% liegen. Ein NE-Effekt kann hierbei nur abgesichert werden, wenn mehr als 200 Metaphasen pro Konzentration ausgewertet werden.
- Ein Vergleich der beiden Testsysteme (CHO-Zellen und Lymphozyten) zeigt eine Reihe widersprüchlicher Ergebnisse: NATARAJAN und OBE (1978) fanden, daß eine G2-Nachbehandlung mit NE+V bei CHO-Zellen die durch MMS induzierte Aberrationsrate steigert, bei Lymphozyten konnte dieser Effekt nicht bestätigt werden. Als Ursache werden unterschiedliche Reparaturkapazitäten vermutet.
- CHO-Zellen, die in der S-Phase behandelt werden (NATARAJAN und OBE 1978), reagieren empfindlicher auf NE als Zellen, die in G1 oder G2 behandelt werden. Bei Behandlung von Lymphozyten mit NE waren alle Zellzyklusstadien in etwa gleich sensitiv.
- Für eine eindeutige Beurteilung der Ergebnisse scheint es wichtig,

daß G2-Zellen und nicht Zellen in der späten S-Phase behandelt werden. Bei Behandlung von Lymphozyten in der späten S-Phase mit Trenimon wurde eine deutliche Beeinflußung der Aberrationsrate durch die Nachbehandlung mit NE gefunden. Bei Trenimonbehandlung und Nachbehandlung mit NE in der späten G2-Phase konnten die Aberrationsraten nicht mehr beeinflußt werden.

1.2. Überprüfung der Aberrationsmodelle mit Hilfe des NE-Testsystems

Unabhängig von der Mutagen induzierten Primärläsion sind DNA-Doppelstrangbrüche verantwortlich für die Entstehung chromosomaler Aberrationen. Dies ist die wichtigste Forderung in Benders Modell zur Entstehung chromosomaler Aberrationen. Doppelstrangbrüche können direkt induziert werden oder durch zelleigene Reparaturprozesse entstehen.

Die G2-Experimente dieser Arbeit können dahingehend interpretiert werden, daß Einzelstrangbrüche durch NE in Doppelstrangbrüche umgewandelt werden und als Folge davon vermehrt Chromatidenaberrationen auftreten. Bender hat diesen Mechanismus in seinem Modell gefordert, mit dem NE-System konnte ein experimenteller Beweis erbracht werden.

G1-Behandlungen mit Mutagenen und Nachbehandlung mit NE lassen nur bedingt Schlußfolgerungen über die Mechanismen der Aberrationsentstehung zu. Ergebnisse mit bestrahlten Zellen zeigen, daß Doppelstrangbrüche, vor der S-Phase durch NE induziert, zu vermehrten Chromosomenaberrationen in der nächsten Mitose führen. Für Zellen, die in G1 mit alkylierenden Agenzien behandelt wurden, kann angenommen werden, daß durch die NE-Behandlung vor der S-Phase sowohl Basenschäden in SSB, als auch SSB in DSB überführt werden, die dann in der nächsten Mitose eine erhöhte Rate an Chromatiden- und Chromosomenaberrationen bedingen. Die deutliche Steigerung der strahleninduzierten Aberrationsrate durch NE spricht gegen die von Revell entworfene Austauschhypothese, das "exchange initiation" Stadium ist mit den NE-Ergebnissen kaum vereinbar. Ein weiterer Widerspruch zu Revells Modellvorstellungen ergibt sich beim Vergleich mit den SCE-Daten dieser Arbeit. Es wurde ein weiterer Hinweis dafür gefunden, daß SCE und Chromatidbrüche zwei voneinander unabhängige Ereignisse sein können. Nach dem von Revell entworfenen Modell sollten aber 40% der Chromatidbrüche von SCEs begleitet sein. Dies

müßte zu einer Erhöhung der SCE-Rate durch die NE-Behandlung führen, was experimentell nicht bestätigt werden konnte.

Für Prestons Behauptung, daß Einzelstrangbrüche und Reparaturvorgänge an der Aberrationsentstehung beteiligt sind, konnte ein indirekter Beweis erbracht werden. Der deutliche Anstieg der Aberrationsrate bei zunehmender Erholungszeit zwischen einer G2-Röntgenbestrahlung und der NE-Nachbehandlung wird durch die im Verlauf von Reparaturprozessen zusätzlich entstehenden Einzelstrangbrüche erklärt. Die Umwandlung dieser SSB durch NE in DSB zeigt, daß Doppelstrangbrüche die verantwortliche Läsion für die Entstehung chromosomaler Aberrationen sind.

LITERATUR

- AARON, C.S., A.A. VAN ZEELAND, G.R. MOHN, A.T. NATARAJAN, G.A.C. KNAAP, A.D. TATES und B.W. GLICKMAN: Molecular dosimetry of the chemical mutagen ethyl methanesulfonate. Quantitative comparison of mutation induction in *Escherichia coli*, V79 Chinese hamster cells and L5178Y mouse lymphoma cells, and some cytological results in vitro and in vivo
Mutat. Res. 69 (1980) 201-216
- AHNSTRÖM, G.: Do mammalian cells leave a fraction of DNA breaks unrepaired after ionizing radiation?
In: A.T. NATARAJAN et al. (Eds.) *Progress in Mutation Res.*, Vol. 4 pp. 351-355
Elsevier Biomedical Press (1982)
- ALLAN, J., P.G. HARTMAN, C. CRANE-ROBINSON und F.X. AVILES: The structure of Histone H1 and its location in chromatin
Nature 288 (1980) 675- 679
- ALLISON, A.C. und G.R. PATON: Chromosomal damage in human diploid cells following activation of lysosomal enzymes
Nature 207 (1965) 1170-1173
- AMES, B.N., J.M.C. CANN und E. YAMASAKI: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test
Mutat. Res. 31 (1975) 347- 364
- AUERBACH, C.: In: *Mutation Research*
Chapman and Hall, London (1976)
- AUERBACH, C. und J.M. ROBSON: Production of mutations by allyl isothiocyanate
Nature (London) 154 (1944) 81
- AUERBACH, C. und J.M. ROBSON: Chemical production of mutations
Nature 157 (1946) 302
- AUERBACH, C., M. MOUTSCHEN -DAHMEN und J. MOUTSCHEN: Genetic and cytogenetical effects of formaldehyde and related compounds
Mutat. Res. 39 (1977) 317-362
- AXELROD, J. und J. REICHENTHAL: The fate of caffeine in man and a method for its estimation in biological material
J. Pharmacol. Exptl. Therap. 107 (1953) 519-523

- BAJER,A.: Subchromatid structure of chromosomes in the living state
Chromosoma 17 (1965) 291-302
- BAUKNECHT,T.T., W.VOGEL, U.BAYER und D.WILD: Comparative in vivo mutagenicity testing by SCE and micronucleus induction in mouse bone marrow
Human Genet. 35 (1979) 299-307
- BEEK,B. und G. OBE: The human leukocyte test system. IV, The use of sister chromatid exchanges as possible indicators for mutagenic activities
Humangenetik 29 (1975) 127-134
- BENDER,M.A., J.S. BEDFORD und J.B. MITCHELL: Mechanisms of chromosomal aberration production.II, Aberrations induced by 5-bromodeoxyuridine and visible light
Mutat. Res. 20 (1973) 403-416
- BENDER,M.A., H.G. GRIGGS und J.S. BEDFORD: Mechanisms of chromosomal aberration production. III, Chemicals and ionizing radiation
Mutat. Res. 23 (1974) 197-212
- BENDER,M.A., H.G. GRIGGS und P.L. WALKER: Mechanisms of chromosomal aberration production.I, Aberration induction by ultraviolet light
Mutat. Res. 20 (1973b) 387-402
- BENEDICT,W., M.S. BAKER, L. HAROUN, E. CHOI und B.N. AMES: Mutagenicity of cancer chemotherapeutic agents in the Salmonella/microsome test
Cancer Res. 37 (1977) 2209-2213
- BENJAMIN, R.C. und D.M. GILL: Poly-(ADP-ribose) synthesis in vitro programmed by damaged DNA. A comparison of DNA molecules containing different types of strand breaks
J. Biol. Chem. 255 (1980) 10502-10508
- BHIDE,S.V., R.A.D'SOUZA, M.M. SAWAI und K.J. RANADIVE: Lung tumor incidence in mice treated with hydrazine sulphate
Int. J. Cancer 18 (1976) 530-535
- BJURSELL,G., E. GUSSANDER und T. LINDAHL: Long regions of single stranded DNA in human cells
Nature 280 (1979) 420-423
- BLOK,J. und H. LOMAN: The effects of γ -radiation in DNA
Current Topics Res. Quart. 9 (1973) 165-245

- BLÖCHER, D. und N. POHLIT: DNA double strand breaks in Ehrlich ascites tumour cells at low doses of X-rays. II. Can cell death be attributed to double strand breaks?
Int. J. Radiat. Biol. 42 (1982) 329-338
- BORNSTEIN, R.S., D.A. HUNGERFORD, G. HALLER, P.F. ENGSTROM und J.W. YARABORO: Cytogenetic effects of bleomycin therapy in man
Cancer Res. 31 (1971) 2004-2007
- BOS, R.P., R.M.E. BROUNS, R. VAN DOORN, J.L.G. THEUWS und P.T. HENDERSON: Involvement of non oxidative enzymes in mutagenic activation of urine from rats, given benzidine and some other aromatic amines
Toxicology 21 (1981) 223-233
- BOYLAND, E., J. HARRIS und E.S. HORNING: The induction of carcinoma of the bladder in rats with acetamidofluorene
Brit. J. Cancer 8 (1954) 647
- BRECHER, S.: Ultrastructural observations of X-ray induced chromatid gaps
Mutat. Res. 42 (1977) 249-268
- BROWNING, E.: In: Toxicity and metabolism of industrial solvents pp713-721
Elsevier, Amsterdam (1965)
- BRYANT, P.E. und D. BLÖCHER: The effects of 9- β -D-arabinofuranosyladenine on the repair of DNA strand breaks in X-irradiated Ehrlich ascites tumour cells
Int. J. Radiat. Biol. 42 (1982) 385-394
- BRØGGER, A.: Is the chromatid gap a folding defect due to protein change? Evidence from mercaptoethanol treatment of human lymphocyte chromosomes
Hereditas 80 (1975) 131-136
- BRØGGER, A.: The chromatid gap - a useful parameter in genotoxicology?
Cytogenet. Cell Genet. 33 (1982) 14-19
- CARRANO, A.V., L.H. THOMPSON, P.A. LINDL und J.L. MINKLER: Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis
Nature 271 (1978) 551-553
- CHU, E.H.Y.: Effects of ultraviolet radiation on mammalian cells. I. Induction of chromosome aberrations
Mutat. Res. 2 (1965) 75-94
- COLD SPRING HARBOUR Symposia on Quantitative Biology (1978)
Vol. 42, Chromatin, Part 1 and 2, CSH 42

- COLLINS, J.M.: Deoxyribonucleic acid structure in human diploid fibroblasts stimulated to proliferate
J. Biol. Chem. 252 (1977) 141-147
- COLLINS, J.M., D.E. BERRY und C.S. COBBS: Structure of parental deoxyribonucleic acid of synchronized HeLa cells
Biochemistry 16 (1977) 5438-5444
- CORRY, P.M. und A. COLE: Radiation induced double strand scission of the DNA of mammalian metaphase chromosomes
Radiat. Res. 36 (1968) 528-543
- COUCH, D.B., N.L. FORBES und A.W. HSIE: Comparative mutagenicity of alkylsulfate and alkanesulfonate derivatives in Chinese Hamster ovary cells
Mutat. Res. 57 (1978) 217-224
- CREMER, C., T. CREMER und M. SIMICKOVA: Induction of chromosome shattering and micronuclei by ultraviolet light and caffeine. I. Temporal relationship and antagonistic effects of the four deoxyribonucleosides
Env. Mutagen. 2 (1980) 339-351
- CRYER, D.R., C.D. GOLDTHWAITE, S. ZINKER, K.B. LAM, E. STORM, R. HIRSCHBERG, J. BLAMIRE, D.B. FINKELSTEIN und J. MANNUR: Studies on nuclear and mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*
CSH 37 (1974) 17-29
- D'ANDREA, A.D. und W.A. HASELTINE: Sequence specific cleavage of DNA by the antitumor antibiotics neocarzinostatin and bleomycin
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75 (1978) 3608-3612
- DARLINGTON, C.D. und P.C. KOLLER: The chemical breakage of chromosomes
Heredity 1 (1947) 187-221
- DAVIDSON, R.L. und P.S. GERALD: Improved techniques for the induction of mammalian cell hybridization by polyethyleneglycol
Somatic Cell Genet. 2 (1976) 165-176
- DEAN, B.J. und G. HODSON-WALKER: An in vitro chromosome assay using cultured rat-liver cells
Mutat. Res. 64 (1979) 329-337
- DEAN, C.J., M.G. ORMEROD, R.W. SERIANNI und P. ALEXANDER: DNA strand breakage in cells irradiated with X-rays
Nature 222 (1969) 1042-1044

- DIMITROV, B.: Nature of chromosome gaps induced by alkylating agents and X-rays as revealed by caffeine treatment
Mutat. Res. 80 (1981) 289-295
- DRESP, J., E. SCHMID und M. BAUCHINGER: The cytogenetic effect of bleomycin on human peripheral lymphocytes in vitro and in vivo
Mutat. Res. 56 (1978) 341-353
- DRUCKREY, H., H. KRUSE, R. PREUSSMANN, S. IVANKOVIC und C. LANDSCHÜTZ: Cancerogene alkylierende Substanzen, III. Alkyl-halogenide, -sulfate, sulfonate und ringgespannte Heterocyclen
Z. Krebsforschung 74 (1970) 241-273
- DUDIN, G. B. BEEK und G. OBE: The human leucocyte test system, I. DNA synthesis and mitosis in PHA stimulated 2-day-cultures
Mutat. Res. 23 (1974) 279-281
- DU PRAW, E. J.: DNA and Chromosomes, 340 pp
Holt, Rinehart und Winston, New York (1970)
- ELLIOT, J. und A. R. GREGORY: Mutagenicity of a series of benzidine congener based dyes
Vet. Hum. Toxicol. 22 (1980) 413-417
- ERIKSSON, C. J. P.: Acetaldehyde metabolism in vivo during ethanol oxidation; In: Gross, M. M. (Ed): Alcohol Intoxication and Withdrawal; Vol. III a; Biological Aspects of Ethanol; pp 319-341
Plenum New York (1977)
- EVANS, H. J.: Chromosome aberrations induced by ionizing radiations
Int. Rev. Cytol. 13 (1962) 221-321
- EVANS, H. J.: In: D. SCOTT, B. A. BRIDGES, F. H. SOBELS (Eds.) : Progress in Genetic Toxicology; pp. 57-74; (1977)
- EVANS, H. J. und D. SCOTT: The induction of chromosome aberrations by nitrogen mustard and its dependence on DNA synthesis
Proc. R. Soc. London Ser. B. 173 (1969) 491-512
- FELDMAN, M. Y.: Reactions of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde
Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 13 (1973) 1-49
- FELSENFELD, G.: Chromatin
Nature 271 (1978) 115-122
- FONTIGNIE-HOUBRECHTS, N.: Genetic effects of formaldehyde in the mouse
Mutat. Res. 88 (1981) 109-114

- FORNACE, A.J. und K.W. KOHN: DNA-protein cross-linking by ultraviolet radiation in normal human and xeroderma pigmentosum fibroblasts
Biochim. Biophys. Acta 435 (1976) 95-103
- FORNACE, J.R., A.J. und J.B. LITTLE: DNA crosslinking induced by X-rays and chemical agents
Biochem. Biophys. Acta 477 (1977) 343-355
- FORNACE, A.J., H. NAGASAWA und J.B. LITTLE: Relationship of DNA repair to chromosome aberrations, sister-chromatid exchanges and survival during liquid-holding recovery in X-irradiated mammalian cells
Mutat. Res. 70 (1980) 323-336
- FRANCIS, A.A., R.D. SNYDER, W.C. DUNN und J.D. REGAN: Classification of chemical agents as to their ability to induce long- or short patch DNA repair in human cells
Mutat. Res. 83 (1981) 159-169
- FREIFELDER, D.: DNA strand breakage by X-irradiation
Radiat. Res. 29 (1966) 329-338
- GALL, J.G.: Kinetics of deoxyribonuclease action on chromosomes
Nature 198 (1963) 36-38
- GALLOWAY, S.M. und S. WOLFF: The relation between chemically induced sister-chromatid exchanges and chromatid breakage
Mutat. Res. 51 (1979) 297-307
- GASCOIGNE, E.W., A.C. ROBINSON und W.J. HARRIS: The effect of caffeine upon cell survival post-replication repair of DNA after treatment of BHK 21 cells with either UV irradiation or N-Methyl-N-Nitrosoguanidine
Chem. Biol. Interactions 36 (1981) 107-116
- GLATT, H.R., M. METZLER und F. OESCH: Diethylstilbestrol and 11 derivatives. A mutagenicity study with *Salmonella typhimurium*
Mutat. Res. 67 (1979) 113-121
- GOLDWATER, L.I., A.I. ROSSO und M. KLEINFELD: Bladder tumors in a coal tar dye plant
Arch. Environ. Health 11 (1965) 814
- GRIGGS, H.G. und M.A. BENDER: Photoreactivation of ultraviolet - induced chromosomal aberrations
Science 179 (1973) 86-88
- GUTTENPLAN, J.B.: Comutagenic effects exerted by N-nitroso compounds
Mutat. Res. 66 (1979) 25-32

- HAGLUND, U. und L. ZECH: Simultaneous staining of sister chromatid exchanges and Q-bands in human chromosomes after treatment with methyl methane sulphonate, quinacrine mustard and quinacrine
Human Genet. 49 (1979) 307-317
- HAIDLE, C.W., K.K. WEISS und M.T. KUO: Release of free bases from deoxyribonucleic acid after reaction with bleomycin
Mol. Pharmacol. 8 (1972) 531-537
- HAN, A., M. KORBELIK und J. BAN: DNA-to-protein cross-linking in synchronized HeLa cells exposed to ultra-violet light
Int. J. Radiat. Biol. 27 (1975) 63-74
- HARIHARAN, P.V., J.F. REMSEN und P.A. CERUTTI: Excision repair of gamma-ray damaged thymine in bacterial and mammalian systems
In: P.C. HANAWALT und R.B. SETLOW (Eds.), *Molecular Mechanisms for Repair of DNA, Part A*, pp 51-59
Plenum New York, 1975
- HENSON, P.: The presence of single-stranded regions in mammalian DNA
J. Mol. Biol. 119 (1978) 487-506
- HEYTING, C., A. HUIGEN und L. DEN ENGELSE: Repair of ethylnitrosourea induced lesions and in situ breaks
Carcinogen. 1 (1980) 769-778
- HITTELMAN, W.N. und P.N. RAO: Premature chromosome condensation, II, The nature of chromosome gaps produced by alkylating agents and ultraviolet light
Mutat. Res. 23 (1974) 259-266
- HOFFMANN, G.R.: Genetic effects of dimethyl sulphate, diethylsulphate and related compounds
Mutat. Res. 75 (1980) 63-120
- HORIKAWA, M., O. NIKAIIDO, T. TANAKA und T. SUGAHARA: Carcinogenesis in tissue culture, X. Rejoining of single-strand breaks in DNA of mammalian cells induced by chemical carcinogens (4-nitroquinoline 1-oxide and its derivative) in vitro
Exp. Cell Res. 59 (1970) 147-152
- IKENAGA, M., H. TAKEBE und Y. ISHI: Excision repair of DNA base damage in human cells treated with the chemical carcinogen 4-Nitroquinoline 1-Oxide
Mutat. Res. 43 (1977) 415-427

- ILIAKIS, G., M. NÜSSE und P. BRYANT: Effects of aphidicolin on cell proliferation, repair of potentially lethal damage and repair of DNA strand breaks in Ehrlich ascites tumour cells exposed to X-rays
Int. J. Radiat. Biol. 42 (1982) 417-434
- ISHIDATE, M. und S. ODASHIMA: Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro - a screening for chemical carcinogens
Mutat. Res. 48 (1977) 337-354
- IVETT, J. L. und R. R. TICE: Diethylstilbestrol-Diphosphate induces chromosomal aberrations but not sister chromatid exchanges in murine bone marrow cells in vivo
Env. Mutagen. 3 (1981) 445-452
- KATO, H.: Spontaneous sister chromatid exchanges dedected by a BUDR-labelling method
Nature 251 (1974) 70-72
- KATO, A. C. und M. J. FRASER: Action of single-strand specific *Neurospora crassa* endonuclease on ultraviolet light-irradiated native DNA
Biochim. Biophys. Acta 312 (1973) 645-655
- KAVENOFF, R. und B. H. ZIMM: Chromosome-sized DNA molecules from *Drosophila*
Chromosoma 41 (1973) 1-27
- KAVENOFF, R., L. C. KLOTZ und B. H. ZIMM: On the nature of chromosome-sized DNA molecules
CSH 37 (1974) 1-8
- KIHLMAN, B. A.: The effect of 5-halogenated deoxyuridines on the frequency of X-ray-induced chromosomal aberrations in *Vicia faba*
Hereditas 49 (1963) 353-370
- KIHLMAN, B. A.: Sub-chromatid exchanges and the strandedness of chromosomes
Hereditas 65 (1970) 171-186
- KIHLMAN, B. A.: Effects of caffeine on the genetic material
Mutat. Res. 26 (1974) 53-71
- KIHLMAN, B. A. und D. KRONBORG: Caffeine, caffeine derivatives and chromosomal aberrations. V. The influence of temperature and concentration on the induced aberration frequency in *Vicia faba*
Hereditas 71 (1972) 102-118

- KIHLMAN, B.A., T. ERIKSSON und G. ODMARK: Effects of hydroxyurea on the chromosomes, cell division and nucleic acid synthesis in *Vicia faba*
Hereditas 55 (1966) 386-397
- KIHLMAN, B.A., A.T. NATARAJAN und H.C. ANDERSSON: Use of the 5-brom-deoxyuridine-labelling technique for exploring mechanisms involved in the formation of chromosomal aberrations, I, G₂-experiments with root-tips of *Vicia faba*
Mutat. Res. 52 (1978) 181-198
- KIHLMAN, B.A., S. STURELID, B. HARTLEY-ASP und K. NILSSON: The enhancement of chromosomal aberrations induced in plant and animal cells by chemical and physical agents
Mutat. Res. 26 (1974) 105-122
- KIHLMAN, B.A., S. STURELID, K. NORLEN und D. TIDRIKS: Caffeine, caffeine derivatives and chromosomal aberrations, II. Different responses of *Allium* root tips and Chinese hamster cells to treatments with caffeine, 8-ethoxy caffeine and 6-methylcoumarin
Hereditas 69 (1971) 35-50
- KLAMERTH, O.L. und M. KOPUN: The influence of trenimon upon deoxy-ribonucleic acid in vitro
Eur. J. Biochem. 21 (1971) 199-203
- KÜLMARK, G.: Differential response to mutagens as studied by Neurospora reverse mutation test
Hereditas 39 (1953) 270-276
- KORENBERG, J.R. und E.F. FREEDLENDER: Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges
Chromosoma 48 (1974) 355-360
- KORNBERG, R.D.: Structure of chromatin
A. Rev. Biochem. 46 (1977) 931-954
- KORTE, A., G. OBE, J. INGWERSEN und G. RÜCKERT: Influence of chronic ethanol uptake and acute acetaldehyde treatment on the chromosomes of bone marrow cells and perinheral lymphocytes of Chinese hamsters
Mutat. Res. 88 (1981) 385-395
- KREPINSKY, A.B., J.A. HEDDLE und J. GERMAN: Sensitivity of Bloom's syndrome lymphocytes to Ethyl Methane sulfonate
Human Genet. 50 (1979) 151-156

- KUO, M.T. und C.W. HAIDLE: Characterization of chain breakage in DNA induced by bleomycin
Biochim. Biophys. Acta 335 (1973) 109-114
- LASKEY, R.A. und W.C. EARNSHAW: Nucleosome assembly
Nature 286 (1980) 763-767
- LATT, S.A.: Localization of sister chromatid exchange in human chromosomes
Science 185 (1974) 74-76
- LAWLEY, P.D.: Some chemical aspects of dose-response relationship in alkylation mutagenesis
Mutat. Res. 23 (1974) 283-295
- LAWLEY, P.D. und P. BROOKES: Further studies on the alkylation of nucleic acids and their constituent nucleotides
Biochem. J. 89 127-138
- LAWLEY, P.D., D.J. ORR und M. JARMAN: Isolation and identification of products from alkylation of nucleic acids: ethyl- and isopropyl-purines
Biochem J. 145 (1975) 73-84
- LEHMANN, A.R.: Effect of caffeine on DNA synthesis in mammalian cells
Biophys. J. 12 (1972) 1316-1325
- LIEBER, C.S.: The metabolism of alcohol
Sci. Am. 234 (1976) 25-33
- LILLEY, D.M.J. und J.F. PARDON: Structure and function of chromatin
A. Rev. Genet. 13 (1979) 197-233
- LINDAHL-KIESSLING, K., B. SANTESSON und J.A. BOOK: Chromosome and chromatid type aberrations induced by Cobalt⁶⁰ irradiation and tritiated uridine in human leukocyte cultures
Chromosoma 31 (1970) 280-284
- LINKE, A.: Die Behandlung von Hämoblastosen und malignen Tumoren mit Trisäthyleniminobenzochinon
Dtsch. Med. Wschr. 85 (1960) 1928 und 1933-1936
- LINN, S. und I.R. LEHMANN: An endonuclease from *Neurospora crassa* specific for polynucleotides lacking an ordered structure. I. Purification and properties of the enzyme
J. Biol. Chem. 240 (1965a) 1287-1293

- LINN, S. und I.R. LEHMANN: An endonuclease from *Neurospora crassa* specific for polynucleotides lacking an ordered structure. II. Studies of enzyme specificity
J. Biol. Chem. (1965b) 1294-1304
- MC CANN, J., E. CHOI, E. YAMASAKI und B.N. AMES: Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals
Proc. Nat. Acad. Sci. 72 (1975) 5135-5139
- MC COY, E., L.A. PETRULLO, H.S. ROSENKRANZ R. MERMELSTEIN: 4-nitroquinoline-1-oxide: factors determining its mutagenicity in bacteria
Mutat. Res. 89 (1981) 151-159
- MC LACHLAN, J.A.: Prenatal exposure to diethylstilbestrol in mice: Toxicological studies
J. Toxicol. Environ. Health 2 (1977) 527-537
- MC LACHLAN, J.A., R.R. NEWBOLD und B. BULLOCK: Reproductive tract lesions in male mice exposed prenatally to diethylstilbestrol
Science 190 (1975) 991-992
- MIRABELLI, C.K., C.H. HUANG und S.T. CROOKE: Comparison of DNA damage and single- and double-strand breakage activities on PM2 DNA by talisomycin and bleomycin analogs
Cancer Res. 40 (1980) 4173-4177
- MIYAKI, M., T. ONO, S. HORI und H. UMEZAWA: Binding of bleomycin-sensitive and resistant rat ascites hepatoma cells
Cancer Res. 35 (1975) 2015-2019
- MONTESANO, R. und H. BARTSCH: Mutagenic and carcinogenic N-nitroso compounds: possible environmental hazards
Mutat. Res. 32 (1975) 179-228
- MOORE, C.W.: Bleomycin induced mutation and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*
Mutat. Res. 58 (1978) 41-49
- MULLER, H.J.: Artificial transmutation of the gene
Science 66 (1927) 84-87
- MULLER, H.J.: The nature of the effects produced by radiation,
In: A. HOLLAENDER (Ed.), Radiation Biology, Part 1, Chapter 7,
pp351-473
Mc Graw-Hill, New York 1954(a)

- MULLER, H.J.: The manner of production of mutations; In: A. HOLLAENDER (Ed.)
Radiation, Biology, Part 1, Chapter 8, pp. 475-626
Mc Graw-Hill, New York, 1954(b)
- MÜLLER, W.E.G., Z. YAMAZAKI, H.J. BREITER und R.K. ZAHN: Action of bleo-
mycin on DNA and RNA
Eur. J. Biochem. 31 (1972) 518-525
- NATARAJAN, A.T.: Molecular aspects of the origin of chromosome struc-
tural changes
Biol. Zbl. 95 (1976) 139-156
- NATARAJAN, A.T.: Relationship between sister-chromatid exchanges and
chromosomal aberrations; In: Sister-Chromatid-Exchange Test
D.MÜLLER et al. (Eds.)
Georg Thieme Verlag 1982
- NATARAJAN, A.T. und G.OBE: Molecular mechanisms involved in the produc-
tion of chromosomal aberrations, I. Utilization of Neurospora
endonuclease for the study of aberration production in G2-
stage of the cell cycle
Mutat. Res. 52 (1978) 137-149
- NATARAJAN, A.T. und A.C. VAN KESTEREN-VAN LEEUWEN: Mutagenic activity
of 20 coded compounds in chromosome aberrations/ sister
chromatid exchanges assay. Using Chinese Hamster Ovary (CHO)
cells, In: F.J. DE SERRES und J. ASHBY (Eds.), Evaluation of
short-term tests for carcinogens, pp 551-559, 1981
- NATARAJAN, A.T. und T.S.B. ZWANENBURG: Mechanisms for chromosomal
aberrations in mammalian cells
Mutat. Res. 95 (1982) 1-6
- NATARAJAN, A.T., I.CSUKAS und A.A. VAN ZEELAND: Contribution of incor-
porated 5-bromdeoxyuridine in DNA to the frequencies of sister-
chromatid exchanges induced by inhibitors of poly-(ADP-ribose)
polymerase
Mutat. Res. 84 (1981) 125-132
- NATARAJAN, A.T., B.A. KIHLMAN und G.OBE: Use of the 5-bromdeoxyuridine-
labelling technique for exploring mechanisms involved in the
formation of chromosomal aberrations. II. G1 experiments with
Chinese hamster ovary cells
Mutat. Res. 73 (1980) 307-317

- NATARAJAN, A.T., G. OBE, A.A. VAN ZEELAND, F. PALITTI, M. MEIJERS und E.A.M. VERDEGAAL-IMMERZEEL: Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. II. Utilization of Neurospora endonuclease for the study of aberration production by X-rays in G1 and G2 stages of the cell cycle
Mutat. Res. 69 (1980) 293-305
- NATARAJAN, A.T., A.A. VAN ZEELAND, E.A.M. VERDEGAAL-IMMERZEEL und A.R. FILON: Studies on the influence of photoreactivation on the frequencies of UV-induced chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges and pyrimidine dimers in chicken embryonic fibroblasts
Mutat. Res. 69 (1980) 307-317
- NEALE, S.: Mutagenicity of nitrosamides and nitrosamidines in microorganisms and plants
Mutat. Res. 32 (1975) 229-266
- NEARY, G.J. und H.J. EVANS: Chromatid breakage by irradiation and the oxygen effect
Nature 182 (1958) 890-891
- NEARY, G.J. und J.R.K. SAVAGE: Chromosome aberrations and the theory of RBE. II. Evidence from track-segment experiments with protons and alpha particles
Int. J. Radiat. Biol. 11 (1966) 209-223
- NEARY, G.J., V.J. HORGAN, D.A. BANCE und A. STRETCH: Further data on DNA strand breakage by various radiation qualities
Int. J. Radiat. Biol. 22 (1972) 525-537
- NEARY, G.J., V.F.W. SIMPSON-GILDEMEISTER und A.R. PEACOCKE: The influence of radiation quality and oxygen on strand breakage in dry DNA
Int. J. Radiat. Biol. 18 (1970) 25-40
- NEBEL, B.R.: Structure of Tridascantia and Trillium chromosomes with particular emphasis on number of chromonemata
CSH 9 (1941) 7-12
- NOVICK, A. und L. SZILARD: Experiments on spontaneous and chemically induced mutation of bacteria growing in the chemostat
CSH 16 (1951) 337-343
- OBE, G. und B. BEEK: Mutagenic activity of aldehydes
Drug and Alcohol Dependence 4 (1979a) 91-94

- OBE,G. und B. BEEK: Trenimon: Biochemical,physiological and genetic effects on cells and organisms
Mutat. Res 65 (1979b) 21-70
- OBE,G. und A.T. NATARAJAN: Comparison between inactivated Sendai virus, poly ethylene glycol and tween 80 as permeabilizing agents for introduction of Neurospora endonuclease into X-irradiated cells
Mutat. Res. 71 (1980) 133-138
- OBE,G., B. BEEK und G.DUDIN: The human leucocyte test system. V. DNA synthesis and mitosis in PHA stimulated 3-day-cultures Humangenetik 28 (1975) 295-302
- OBE,G., S. KALWEIT, C. NOWAK und F. ALI-OSMAN: Liquid holding experiments with human peripheral lymphocytes. I. Effects of liquid holding on sister chromatid exchanges induced by trenimon, diepoxybutane, bleomycin and X-rays
Biol. Zentralblatt 101 (1982) 97-113
- OBE,G., A.T. NATARAJAN, M. MEYERS und A. DEN HERTOEG: Induction of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of blood in vitro, and of SCE's in bone - marrow cells of mice by ethanol and its metabolite acetaldehyde
Mutat. Res. 68 (1979) 291-294
- OBE,G., A.T. NATARAJAN und F.PALITTI: Role of DNA double-strand breaks of radiation induced chromosomal aberrations
In: A.T.NATARAJAN et al. (Eds.) Progress in Mutation Research Vol 4, pp 1-9
Elsevier Biomedical Press, 1982
- OEHLKERS,F.: Die Auslösung von Chromosomenmutationen in der Meiosis durch Einwirkung von Chemikalien
Z. VererbungsL. 81 (1943) 313-341
- OLINS,A.L. und D.E. OLINS: Spheroidchromatin units (✓-bodies)
Science 183 (1974) 330-332
- O'NEILL,J.P., R.L. SCHENLEY und A.W. HSIE: Cytotoxicity and mutagenicity of alkylating agents in cultured mammalian cells (CHO/HGPRT-system): mutagen treatment in the presence or absence of serum
Mutat. Res. 63 (1979) 381-385

- OPPENHEIM, J.J. und W.N. FISHBEIN: Induction of chromosome breaks in cultured normal human leukocytes by potassium arsenite, hydroxy-urea and related compounds
Cancer Res. 25 (1965) 980-985
- OSTERTAG, W. und J. GREIF: Die Erzeugung von Chromatidenbrüchen durch Coffein in Leukozytenkulturen des Menschen
Humangenetik 3 (1967) 282- 294
- OTSUJI, N.: W-reactivation and W-mutagenesis of λ -phage damaged by methylmethanesulfonate in recA and lexA strains of *Escherichia coli*
Mutat. Res. 69 (1980) 381-384
- OUDET, P., M. GROS-BELLARD und B. CHAMBON: Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit
Cell 4 (1975) 281-300
- PAIKA, K. und A. KRISHAN: Bleomycin induced chromosomal aberrations in cultured mammalian cells
Cancer Res. 33 (1973) 961-965
- PAINTER, T.S. und H.J. MULLER: Parallel cytology and genetics of induced translocations and deletions in *Drosophila*
J. Hered. 20 (1929) 287-298
- PERRY, P. und H.J. EVANS: Cytological detection of mutagen carcinogen exposure by sister chromatid exchange
Nature 258 (1975) 121-126
- PERRY, P. und S. WOLFF: New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids
Nature 251 (1974) 156-158
- PETES, T.D., C.S. NEWLON, B. BEYERS und W.L. FANGMAN: Yeast chromosomal DNA: Size, structure and replication
CSH 37 (1974) 9-16
- POPESCU, N.C., S.C. AMSBAUGH und J.A. DIPAOLO: The relevance of caffeine post-treatment to SCE incidence induced in Chinese hamster cells
Mutat. Res. 60 (1979) 313-320
- PRESCOTT, D.M.: The structure and replication of eucaryotic chromosomes. In: D.M. PRESCOTT, L. GOLDSTEIN und E. MC CONKEY (Eds.), *Advances in Cell Biology*, Vol 1, pp57-117
North-Holland, Amsterdam, 1970

- PRESTON, R.J.: The effect of cytosine arabinoside on the frequency of X-ray-induced chromosome aberrations in normal human leukocytes
Mutat. Res. 69 (1980) 71-79
- PRESTON, R.J.: The use of inhibitors of DNA repair in the study of the mechanisms of induction of chromosome aberrations
Cytogenet. Cell Genet. 33 (1982) 20-26
- PRESTON, R.J.: DNA repair and chromosome aberrations: interactive effects of radiation and chemicals
In: A.T. NATARAJAN et al. (Eds.), Progress in Mutation Research, Vol 4, pp 25-35
Elsevier Biomedical Press, 1982
- PRESTON, R.J. und P.C. GOOCH: The induction of chromosome-type aberrations in G1 by Methyl methanesulfonate and 4-Nitroquinoline-N-oxide, and the non-requirement of an S-phase for their production
Mutat. Res. 83 (1981) 395-402
- RAO, P.N. und J. ENGELBERG: Structural specificity of estrogens in the induction of mitotic chromatid non-disjunction in HeLa cells
Exp. Cell Res. 48 (1967) 71-81
- RASKO, I., T. RETVALVI, K. BURG und L. DALLMANN: Gene mutation and sister chromatid exchange in Chinese hamster cells
Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 30 (1979) 355-361
- RAY, J.H. und L.C. ALTENBURG: Sister chromatid exchange induction by sodium selenite: dependence on the presence of red blood cells or red blood cell lysate
Mutat. Res. 54 (1978) 343-354
- REVELL, S.H.: The accurate estimation of chromatid breakage, and its relevance to a new interpretation of chromatid aberrations induced by ionizing radiations
Proc. R. Soc. London Ser. B 150 (1959) 563-589
- REVELL, S.H.: Evidence for a dose-squared term in the dose response curve for real chromatid discontinuities induced by X-rays, and some theoretical consequences there of
Mutat. Res. 3 (1966) 34-53

- RISTOW, H. und G. OBE: Acetaldehyde induces cross-links in DNA and causes sister chromatid exchanges in human cells
Mutat. Res. 58 (1978) 115-119
- ROBERTS, J. J. und J. E. STURROCK: Enhancement by caffeine of N-methyl-N-nitrosourea induced mutations and chromosome aberrations in Chinese hamster cells
Mutat. Res. 20 (1973) 243-255
- ROSIN, M. P. und H. F. STICH: The inhibitory effect of cysteine on the mutagenic activities of several carcinogens
Mutat. Res. 54 (1978) 73-81
- ROTI, J. L. und P. A. CERUTTI: Gamma-ray induced thymine damage in mammalian cells
Int. J. Radiat. Biol. 25 (1974) 413-417
- RUSSEL, W. L., E. M. KELLY, P. R. HUNSICKER, J. W. BANGHAM, S. C. MADUX und E. L. PHIPPS: Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in mouse
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76 (1979) 5818-5819
- RÜDIGER, H. W., F. HAENISCH, M. METZLER, F. OESCH und H. R. GLATT: Metabolites of diethylstilbestrol induce sister chromatid exchange in human cultured fibroblasts
Nature 281 392-394 (1979)
- SAITO, M. und T. ANDOH: Breakage of a DNA-protein complex induced by bleomycin and their repair in cultured mouse fibroblasts
Cancer Res. 33 (1973) 1696-1700
- SASAKI, Y. und R. ENDO: Mutagenicity of aldehydes in Salmonella
Mutat. Res. 54 (1978) 251-252
- SAVAGE, J. R. K., R. J. PRESTON und G. J. NEARY: Chromatid aberrations in Tradescantia bracteata and a further test of Revell's hypothesis
Mutat. Res. 5 (1968) 47-56
- SAWADA, M. und M. ISHIDATE: Colchicine-like effect of diethylstilbestrol (DES) on mammalian cells in vitro
Mutat. Res. 57 (1978) 175-182
- SAX, K.: An analysis of X-ray induced chromosomal aberrations in Tradescantia
Genetics 25 (1940) 41-68

- SAX,K.: Types and frequencies of chromosomal aberrations induced by X-rays
CSH 9 (1941) 93-103
- SCHEID,W. und H. TRAUT: Ultraviolet-microscopical studies on achromatic lesions ("gaps") induced by X-rays in the chromosomes of *Vicia faba*
Mutat. Res. 10 (1970) 159-161
- SCHEID,W. und H. TRAUT: Visualization of achromatic lesions (gaps) induced by X-rays in chromosomes of *Vicia faba* by staining of chromosomal proteins
Mutat. Res. 12 (1971a) 97-99
- SCHEID,W. und H. TRAUT: Visualization by scanning electron microscopy of achromatic lesions ("gaps") induced by X-rays in chromosomes of *Vicia faba*
Mutat. Res. 11 (1971b) 253-255
- SCHINZEL,A. und W. SCHMID: Lymphocytes chromosome studies in humans exposed to chemical mutagens. The validity of the method in 67 patients under cytostatic therapy
Mutat. Res. 40 (1976) 139-166
- SCHÖNEICH,J., A. MICHAELIS und R. RIEGER: Coffein und die chemische Induktion von Chromatidenaberrationen bei *Vicia faba* und Ascitestumoren der Maus
Biol. Zentralbl. 89 (1970) 49-63
- SCOTT,D. und H.J. EVANS: X-ray-induced chromosomal aberrations in *Vicia faba*: Changes in response during the cell cycle
Mutat. Res. 4 (1967) 579-599
- SEDAT,J. und L. MANUELIDIS: A direct approach to the structure of eukaryotic chromosomes
Cold Spring Harb. Symp. Quart. Biol. 42 (1978) 331-350
- SELLAKUMAR,A.R., R. MONTESANO und U. SAFFIOTTI: Aromatic amines carcinogenicity in hamsters
Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 10 (1969) 78
- SETLOW,R.B.: Photoproducts in DNA irradiated in vivo
Photochem. Photobiol. 7 (1968) 643-649
- SETLOW,R.B. und J.K. SETLOW: Effects of radiation on polynucleotides
Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 1 (1972) 293-346

- SHAFRANOVSKAYA, N.N., E.N. TRIFONOV, Y.S. LAZURKIN und M.D. FRANK-KAMENETSKII: Clustering of thymine dimers in ultraviolet irradiated DNA and the long-range transfer of electronic excitation along the molecule
Nature New Biol. 241 (1973) 58-60
- SINGER, B.: The chemical effects of nucleic acid alkylation and their relation to mutagenesis and carcinogenesis
Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 15 (1975) 219-284
- SIVAK, A., L. RUDENKO und L.G. TEAGUE: Variations among species and celltypes in the effects of caffeine on mutagen-induced cytotoxicity and postreplication repair of DNA
Env. Mutagen. 4 (1982) 143-162
- SKOPEK, T.R., H.L. LIBER, D.A. KADIEN und W.G. THILLY: Relative sensitivities of forward and reverse mutation assays in *Salmonella typhimurium*
Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 75 (1980) 4465-4469
- SLEIGH, M.J. und G.W. GRIGG: Induction of local denaturation in DNA in vitro by phleomycin and caffeine
FEBS Lett. 39 (1974) 35-38
- SLOR, H. und T. LEV: Ultraviolet induced changes in DNA. Possible confusion of repair and degradative enzymes
Biochem. Biophys. Acta 312 (1973) 637-644
- SMITH, K.C.: Physical and chemical changes induced in nucleic acids by ultraviolet light
Radiat. Res. suppl. 6 (1966) 54-79
- SMITH, K.C.: The radiation-induced addition of proteins and other molecules to nucleic acids
In: S.Y. WANG (Ed.) *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids*, Vol. 2, pp187-218
Academic Press, New York 1976
- SOIGNIER, M.A. und W.N. HITTELMAN: The repair of bleomycin-induced DNA damage and its relationship to chromosome aberration repair
Mutat. Res. 62 (1979) 517-527
- SOMERS, C.E. und R.N. HUMPHREY: A chromosome study of radiation sensitization by 5-bromodeoxyuridine
Exp. Cell Res. 30 (1963) 208-217

- SPARVOLI, E., H. GAY und B. P. KAUFMANN: Number and pattern of association of chromonemata in the chromosomes of *Tradescantia*
Chromosoma 16 (1965) 415-435
- STADLER, L. J.: Mutations in barley induced by X-rays and radium
Science 68 (1928) 186-187
- STRNISTE, G. F. und S. S. WALLACE: Endonucleolytic incision of X-irradiated deoxyribonucleic acid by extracts of *Escherichia coli*
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 72 (1975) 1997-2001
- STUBBLEFIELD, E.: The structure of mammalian chromosomes
Int. Rev. Cytol. 35 (1973)
- STURELID, S. und B. A. KIHLMAN: Enhancement by methylated oxypurines of the frequency of induced chromosomal aberrations, II. Influence of temperature on potentiating activity
Hereditas 80 (1975) 233-246
- SUZUKI, H., K. NAGAI, E. AKUTSU, H. YAMAKI, N. TANAKI und H. UMEZAWA: On the mechanism of action of bleomycin strand scission of DNA caused by bleomycin and its binding to DNA in vitro
J. Antibiot. 23 (1970) 473-480
- SWANSON, C. P.: A comparison of chromosomal aberrations induced by X-ray and ultraviolet radiation
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 26 (1940) 366-373
- TADA, M. und M. TADA: Interaction of a carcinogen, 4-nitroquinoline-1-oxide with nucleic acids: chemical degradation of the adducts
Chem. Biol. Interact. 3 (1971) 225-229
- TANAKA, K., M. SEKIGUCHI und Y. OKADA: Restoration of ultraviolet-induced unscheduled DNA synthesis of xeroderma pigmentosum cells by the concomitant treatment with bacteriophage T4 endonuclease V and HVJ (Sendai Virus)
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 72 (1975) 4071-4075
- TAYLOR, J. H.: The replication and organization of DNA in chromosomes
In: *Molecular genetics, part I*, pp 65-111
Academic Press New York, 1963
- THOMAS, C. A.: The genetic organization of chromosomes
Ann. Rev. Genet. 5 (1971) 237-256

- TICE, R.R., G.E. GUGLIELMI und T.F. VOGT: Induction of sister chromatid exchanges and inhibition of cellular proliferation in vitro
I. Caffeine
Env. Mutagen. 4 (1982) 191-200
- TIMOFEEF-RESSOVSKI, N.W.: The experimental production of mutations
Biol. Rev. 9 (1934) 411-457
- TIMSON, J.: Hydroxyurea
Mutat. Res. 32 (1975) 115-132
- UEDA, N., H. UENAKA, T. AKENATSU und T. SUGIYAMA: Parallel distribution of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations
Nature 262 (1976) 581-583
- VAN DER SCHANS, G.P., H.B. CENTEN und P.H.M. LOHMAN: DNA lesions induced by ionizing radiation
In: Progress in Mutation Res., Vol. 4, pp 285-299. A.T. NATARAJAN et al. (Eds.)
Elsevier Biomedical Press 1982
- VAN DUUREN, B.L., L. LANGSETH, L. ORRIS, G. TEEBOR, N. NELSON und K. KUSCHNER: Carcinogenicity of epoxides, lactones and peroxy compounds, IV, tumor response in epithelial and connective tissue in mice and rats
J. Nat. Cancer Inst. 37 (1966) 825-838
- VAN KESTEREN-VAN LEEUWEN, A.C. und A.T. NATARAJAN: Localization of 7-12-Dimethylbenz (a) anthracene induced chromatid breaks and sister chromatid exchanges in chromosomes 1 and 2 of bone marrow cells of rat in vivo
Chromosoma 81 (1980) 473-481
- VAN ZEELAND, A.A., A.T. NATARAJAN, E.A.M. VERDEGAAL-IMMERZEEL und A.R. FILON: Photoreactivation of UV induced cell killing, chromosome aberrations, sister chromatid exchanges, mutations and pyrimidine dimers in *Xenopus laevis* fibroblasts
Mol. Gen. Genet. 180 (1980) 495-500
- VOGEL, E. und A.T. NATARAJAN: The relation between reaction kinetics and mutagenic action of mono-functional alkylating agents in higher eukaryotic systems, I, Recessive lethal mutations and translocations in *Drosophila*
Mutat. Res. 62 (1979a) 51-100

- VOGEL,E. und A.T. NATARAJAN: The relation between reaction kinetics and mutagenic action of mono-functional alkylating agents in higher eukaryotic systems. II. Total and partial sex-chromosome loss in *Drosophila*
Mutat. Res. 62 (1979b) 101-123
- VOGEL,E. und A.T. NATARAJAN: The relation between reaction kinetics and mutagenic action of mono-functional alkylating agents in higher eukaryotic systems: Interspecies comparisons
In: F.J. DE SERRES und A. HOLLAENDER (Eds.) *Chemical Mutagens Principles and Methods for their detection*, Vol. 7, pp 295-329
Plenum Press, New York 1982
- WADE,M.J., J.W. MOYER und C.H. HINE: Mutagenic action of a series of epoxides
Mutat. Res. 66 (1979) 367-371
- WALKER,I.G. und R. SRIDHAR: The formation and repair of single-strand breaks in DNA of cultured mammalian cells treated with UV-light methylating agents or 4-nitroquinoline 1-oxide
Chem. Biol. Interactions 12 (1976) 229-239
- WATSON, J.D. und F.H.C. CRICK: Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid
Nature 171 (1953a) 737-738
- WATSON, J.D. und F.H.C. CRICK: Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid
Nature 171 (1953b) 964-967
- WHEELER,G.P.: Studies related to the mechanisms of action of cytotoxic alkylating agents: A review
Cancer Res. 22 (1962) 651-688
- WOLFF,S.: Strandedness of chromosomes
Int. Rev. Cytol. 25 (1969) 279-296
- WOLFF,S.: Relationship between DNA repair chromosome aberrations and sister chromatid exchanges,
In: HANAWALT,P.C., E.C.FRIEDBERG und C.F.FOX (Eds.): *DNA Repair Mechanisms*, ICN-UCLA Symposia in Molecular and Cellular Biology, IX. p 751
Academic Press, New York, (1978)

- WOLFF, S. und P. PERRY: Differential Giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography
Chromosoma 48 (1974) 341-353
- WOLFF, S. und P. PERRY: Insights on chromosome structure from sister chromatid exchange ratios and the lack of both isolabelling and heterolabelling as determined by the FPG technique
Exp. Cell Res. 93 (1975) 23-30
- WOLFF, S., B. RODIN und J.E. CLEAVER: Sister chromatid exchanges induced by mutagenic carcinogens in normal and xeroderma pigmentosum cells
Nature 265 (1977) 347-349

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Obe für seine hilfreiche Unterstützung, insbesondere für sein ständiges Interesse und zahlreiche Verbesserungsvorschläge bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Natarajan möchte ich für die freundliche Aufnahme am Department of Radiation Genetics and Chemical Mutagenesis (Leiden) und für die experimentelle Zusammenarbeit danken.

Darüberhinaus danke ich den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe "Experimentelle Cytogenetik" am Institut für Allgemeine Genetik der FU Berlin, Frau Kalweit für ihre Diskussionsbereitschaft, Frau Grade, Frau Hille, Frau Jonas, Frau Schmidt und Frau Winkel für Hilfeleistungen bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Dem Umweltbundesamt (Berlin) habe ich für finanzielle Unterstützung zu danken.

LEBENS LAUF

Christian Nowak

29.7.1954	in Berlin geboren
April 1961	Eintritt in die St. Marienschule, Berlin
April 1965	Wechsel zum Canisius Kolleg, Berlin
Dezember 1973	Abitur
SS 1974	Immatrikulation an der Technischen Universität Berlin, Fachbereich Chemie
WS 1975/1976	Wechsel an die Freie Universität Berlin, Fachbereich Biologie
Januar 1978	Vordiplom in Biologie (Allgemeine Biologie und Genetik, Stoffwechselphysiologie, Chemie, Physik)
Februar 1981	Diplom in Biologie, Hauptfach Allgemeine Biologie und Genetik
März 1981	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Rahmen eines Forschungsvorhabens des Umweltbundesamtes Berlin (20 Std./Woche). Beginn der Doktorarbeit am Institut für Allgemeine Genetik der Freien Universität Berlin

